Teofil Crăciun

genetica și societatea

Editura Albatros

ÎN LOC DE PREFAȚĂ

Planeta noastră este confruntată cu mari probleme: foame, sărăcie, inflație, criză energetică, în general, destabilizare economică, politică și socială, precum și cu poluarea mediului, reducerea pămînturilor fertile, „masacrul biologic", deteriorarea plasmei germinative... Societatea umană se află în cea mai gravă criză economică și financiară din perioada postbelică, ca și în cea mai profundă criză ecologică.

Argumente? 20 de țări suferă de pe urma unor penurii alimentare grave, iar în două treimi din cele 54 de țări înregistrate ca avînd un deficit alimentar cronic, în ultimul deceniu producția agricolă pe locuitor a scăzut. Situația tinde să se înrăutățească chiar și dacă ținem seama că din cele circa 13 000 000 km² cultivate pentru producție alimentară, sub acțiunile omului și ale eroziunii se pierd anual peste 7 milioane hectare. În plus, țările sărace, în care trăiesc două treimi din omenire, sînt copleșite de o uriașă datorie externă: peste 800 miliarde de dolari.

Situația în lume este agravată de povara înarmărilor pentru care se cheltuiesc peste 600 miliarde de dolari anual și de amenințarea unui război nuclear.

Remedii? Pentru ca lumea să supraviețuiască, mediul natural să recapete măcar în parte frumusețile irosite și să regenereze biologic, pentru prezervarea vieții, se impune

căutarea sistematică și concertată, pe plan global, a unor soluții de durată. Unele soluții sînt de ordin politic și social: oprirea înarmărilor și eliberarea unor surse prețioase care ar putea fi utilizate în domeniul social, reorganizarea producției alimentare, mai ales în țările în curs de dezvoltare, îmbunătățirea condițiilor de schimburi comerciale între țările sărace și cele dezvoltate în vederea eliminării decalajelor și subdezvoltării, cu alte cuvinte, promovarea unei noi ordini economice internaționale, menită să contribuie la prosperitatea tuturor popoarelor, la progresul general.

Folosirea cuceririlor științei și tehnologiei, în special a geneticii moleculare și ingineriei genetice, poate reprezenta o componentă de bază în lupta pentru supraviețuire. Salvgardarea patrimoniului genetic al Terrei, amplificarea posibilităților biosintetizante ale organismelor utile, revoluționarea tehnologiilor de producție și, ca urmare, reducerea poluării mediului și vieții, apărarea sănătății oamenilor, iată doar cîteva din importantele direcții de acțiune ale geneticii. Organismele manipulate genetic, în special microorganismele, adevărate „mașini", ieftine și foarte productive, pot fabrica proteine, vitamine, hormoni, antibiotice, virocide, anticancerigeni... detergenți, erbicide, îngrășăminte, petrol, etanol... Astfel, genetica în acțiune, în condiții politico-sociale favorabile, poate renaște speranța într-o lume mai bună și un viitor cert.

Cele menționate sînt doar cîteva din numeroasele interacțiuni complexe ale geneticii cu societatea. M-am străduit ca în carte să prezint realizările recente și unele din posibilitățile geneticii care prin transformarea în realitate pot interfera pozitiv cu evoluția societății. Am urmărit ca exemplele date și ponderea acordată să corespundă semnificației acestora în prezent și perspectivă.

Multe dintre descoperirile geneticii sînt încă în faza de promisiuni. Cu siguranță că unele vor deveni „mijloace de muncă", cu efecte hotărîtoare în schimbarea utilă a vieții, în producția de alimente, de medicamente, în depoluarea mediului etc. Astfel, descifrarea secretelor majore ale vieții, dar mai ales perfecționarea manipulării controlate a genelor, sînt contribuții care trebuie privite cu mult optimism.

Conștiința umană și cunoștințele științifice se pot îngemăna atît pentru folosirea constructivă a resurselor și elaborarea modalităților dezarmării și înțelegerii, cît și pentru protejarea mediului ambiant, a plantelor și animalelor, pentru sporirea resurselor alimentare și de materii prime și folosirea lor în beneficiul tuturor.

Problemele abordate pot interesa și preocupa nu numai pe oamenii de știință sau tineri aflați în procesul de instruire, ci un mare număr de cititori, de toate vîrstele și ocupațiile, precum și pe unii dintre cei care într-un fel sau altul sînt implicați ori răspund de viitorul curs al societății sau participă la planificarea resurselor în prezent și în perspectivă.

La definitivarea acestei lucrări m-am bucurat de ajutorul științific concretizat în propuneri și sugestii făcute cu deosebită competență de prof.dr.doc.șt. Corneliu Zolyneak, dr. Constantin Maximilian și dr. Alexandru Ionescu. Pentru aceste contribuții le transmit întreaga recunoștință și multe mulțumiri.

CUPRINS

I

GENOTIPUL ŞI FENOTIPUL

INTRODUCERE ÎN GENETICĂ

Genotipul indică totalitatea genelor şi plasmagenelor, întreaga constituţie genetică sau suma totală a informaţiei genetice, manifestă sau latentă, într-un organism. Genele se găsesc în nucleul celular, dispuse în asociaţii distincte, numite grupe linkage sau cromozomi, în care ocupă poziţii caracteristice — loci (lat. sing. *locus*). Plasmagenele se află în afara nucleului, în citoplasma celulei, în organite cum sînt cloroplastele şi mitocondriile, dispuse, de asemenea, în grupe linkage. Genotipul se moşteneşte de la părinţi.

Materialul constitutiv şi funcţiile genelor

Genele şi plasmagenele sînt molecule complexe formate din acizi nucleici. O asemenea unitate a eredităţii este reprezentată de un segment dintr-o macromoleculă de acid dezoxiribonucleic — ADN, pentru marea majoritate a organismelor (la puţini viruşi: cel care produce mozaicul tutunului — TMV, gripa, poliomielita şi la cîţiva bacteriofagi, genele sînt alcătuite dintr-un segment de acid ribonucleic — ARN). În segmentul de ADN se găseşte o secvenţă liniară bicatenară helicoidală de nucleotizi (alcătuiţi dintr-un radical fosforic, dezoxiriboză şi o bază azotată: adenina — A sau guanina —G, baze purinice, timina —T sau citozina —C, baze pirimidinice), în care se află o cantitate oarecare de informaţie genetică înregistrată biochimic, ce funcţionează unitar în realizarea unei anumite caracteristici ereditare.

Dezoxinucleotizii se leagă unul de altul prin legături fosfodiesterice. Astfel, primul nucleotid, prin grupul fosfat, la nivelul unei grupări acid libere, se leagă de nucleotidul adiacent inferior prin poziția 3', iar de nucleotidul adiacent superior prin poziția 5' etc. În acest fel, între nucleotizi se stabilește o legătură în zigzag (deplasată în spațiu față de axă cu 36°). Se formează astfel un lanț polidezoxiribonucleotidic, cu o lungime variabilă. Aceasta este structura primară sau monocatenară a ADN. În mod obișnuit, molecula de ADN este constituită din două lanțuri polinucleotidice complementare sau două catene: aceasta este structura secundară. Acest tip de structură a fost sugerat de J.D. Watson și F.H.C. Crick, laureați ai Premiului Nobel, în 1953. Aceștia au presupus că molecula de ADN este constituită din două catene răsucite una în jurul celeilalte (helix dublu). Legătura dintre cele două catene, care sînt complementare una alteia, se realizează prin punți de hidrogen între perechi de baze situate la același nivel în cele două catene: două punți de hidrogen între adenină și timină și trei punți între guanină și citozină. Pozițiile stabile ale atomilor de hidrogen (H) în baze sînt esențiale pentru funcțiile ADN, în care se realizează cu necesitate doar perechi A = T sau T = A și G = C sau C = G. Dacă H nu ar avea poziții fixe, adenina ar putea să se împerecheze adesea cu citozina, iar guanina cu timina. Împerecherea obligatorie A = T și G = C și reciproc, face ca cele două catene ale moleculei de ADN să fie complementare, deoarece de ordinea în care se succed nucleotizii într-o catenă depinde ordinea nucleotizilor în cealaltă catenă.

Perechile de baze A = T și G = C se găsesc în centrul moleculei de ADN, formînd treptele, iar dezoxiriboza și radicalul fosforic fiind dispuse lateral formează scheletul helixului dublu. Spațiul între doi nucleotizi succesivi este de 3,4 Å (grosimea unei baze este de 3,4 Å), iar ambele catene fac o spiră completă (o rotire a helixului cu 360°) la intervale de 34 Å, care implică 10 perechi de nucleotizi A = T și G = C. În molecula de ADN cele două catene complementare au o orientare spațială inversă determinată de poziția diferită a legăturilor dintre pentoză și radicalul fosforic. Astfel, la același nivel al bicatenei, într-o catenă grupul fosfat este adiționat la poziția 3', iar în cealaltă catenă, complementară, în poziția 5' a dezoxiribozei.

Segmentul de ADN dintr-o genă, respectiv gena (sau plasmagena), are două funcții: autoreplicarea (funcția autocatalitică) și biosinteza proteică (funcția heterocatalitică). Funcția autocatalitică a genei constă în replicarea proprie pe baza sintezei semiconservative a moleculei constitutive de ADN. Pentru aceasta, molecula bicatenară-mamă se despiralizează, iar cele două catene servesc drept matrice pentru formarea sau sinteza enzimatică (cu ajutorul ADN-polimerazei) a celei de a doua catene complementare. În acest fel rezultă două molecule bicatenare — fiice. Dar în fiecare din aceste două bicatene-fiice, una dintre catene este veche — matricea, iar a doua este nouă, complementară matricei. Deci, sinteza replicativă a ADN este semiconservativă, fapt ce face ca cele două molecule bicatenare-fiice să fie identice cu molecula bicatenară-mamă. La rîndul lor, noile molecule bicatenare de ADN se replică semiconservativ, fapt care conferă continuitate și stabilitate genelor. ADN, respectiv, genele, se autoreplică în procesul diviziunii celulare (anterior diviziunii, în interfază, în așa-numita perioadă S — sinteza ADN).

Funcția heterocatalitică a genei constă în controlul mecanismelor biosintezei, ratei și specificității unei proteine caracteristice. Această funcție se realizează prin transformarea informației din genă determinată de succesiunea nucleotizilor (a bazelor azotate) într-o succesiune de aminoacizi dintr-un lanț polipeptidic. Biosinteza proteică are loc tot în timpul diviziunii celulare, la începutul interfazei, în prima perioadă a acesteia — numită G_1 (gol sintetic, anterioară perioadei S). Urmînd unei diviziuni a materialului nuclear și celular, celula-fiică are un volum redus la jumătate. Pentru aducerea volumului celulei la nivelul normal, moleculele de ADN din cromozomi, respectiv genele, realizează acțiunea lor primară care constă în sinteza unei proteine cu o structură specifică și în cantitățile necesare celulei. Acțiunea primară a genei stă la baza metabolismului și biosintezei celulare, inclusiv a formării diverselor structuri din celule, deoarece toate aceste procese sînt guvernate de proteine active sau enzime.

Acțiunea primară sau funcția heterocatalitică a genei constă, așadar, în producerea unui lanț polipeptidic specific, prin controlarea secvenței aminoacizilor din acesta. Rezultă

astfel — o proteină — enzimă cu proprietatea de a cataliza doar o anumită reacţie chimică. Cercetările au evidenţiat faptul că gena sau materialul din care este formată — segmentul de ADN — nu participă şi nu serveşte direct ca matrice pentru poziţionarea aminoacizilor în proteina specifică. Mai întîi, informaţia genetică din ADN este transferată, prin transcripţie, unor molecule de ARN (ARN mesager — mARN), care după ce migrează din nucleu în citoplasmă vor servi ca matrice intermediare pentru ordonarea secvenţelor de aminoacizi în proteina specifică. ADN din gene, în procesul transcripţiei, alături de sinteza mARN, serveşte la sinteza şi a altor două tipuri de ARN celular: solubil — sARN şi ribozomal — rARN, implicate, de asemenea, în biosinteza proteică. Deci, în funcţia heterocatalitică ADN este matrice (în nucleu) pentru ARN, iar ARN (celular) este matrice pentru proteine, între cantitatea de ARN transcrisă şi proteinele sintetizate existînd un raport direct proporţional. Procesul transformării secvenţei de nucleotizi din ADN — genă, într-o secvenţă de aminoacizi într-un lanţ polipeptidic, la nivelul uzinelor proteosintetice reprezentate de ribozomi, a fost numit translaţie.

Codul genetic. În genă — ADN, informaţia genetică este scrisă cifrat, prin patru simboluri chimice, reprezentate de bazele azotate: A, T, G, C. Din combinarea acestor simboluri — litere se formează cuvintele sau codonii, din asocierea cărora rezultă frazele — segmentele de acid nucleic sau genele. Aceste segmente de ADN — gene îşi dezvăluie rolul căpătînd un „sens" după ce mesajul cifrat purtat este descifrat sau tradus prin intermediul unui „cod", care dă echivalenţă simbolurilor. Codul genetic a fost „descifrat" prin intense cercetări *in vivo* şi *in vitro*, desfăşurate după 1962, anul descoperirii mARN (ARN mesager). Aceste cercetări au permis stabilirea corespondenţei dintre succesiunea nucleotizilor în macromolecula de ADN dintr-o genă, mARN transcris pe una din catenele acesteia, şi succesiunea aminoacizilor în lanţul polipeptidic. Deci, codul genetic reprezintă corespondenţa care există între grupele de nucleotizi din moleculele de acizi nucleici din gene şi aminoacizii incluşi în lanţurile polipeptidice sintetizate. În toate organismele

de pe Terra funcţionează aceeaşi corespondenţă codon — aminoacid, deci codul genetic este „universal".

Plecînd de la faptul că proteinele sînt alcătuite din lanţuri polipeptidice, formate dintr-o succesiune specifică a 20 de aminoacizi proteici, G. Gamow, în 1954, a considerat că numai o secvenţă de 3 nucleotizi — baze poate realiza codificarea sau poziţionarea celor 20 aminoacizi într-un lanţ polipeptidic. Or, cele patru baze: A, T, G, C pot realiza 4^3 succesiuni de trei ceea ce înseamnă că ele pot fi dispuse în 64 codoni. Un codon reprezintă aşadar un grup de trei baze azotate succesive care codifică un aminoacid. Dar, numărul tripletelor de baze, a codonilor sau cuvintelor de cod, depăşeşte de trei ori numărul aminoacizilor. Înseamnă că mai mulţi codoni pot semnifica acelaşi aminoacid, cu alte cuvinte codul genetic este împărţit sau „degenerat" în 20 de grupe de codoni care codifică 20 de aminoacizi. Dintre codoni, 61 sînt numiţi *cu sens* deoarece au proprietatea de a codifica un anumit aminoacid, iar 3 sînt *codoni stop* care indică separarea genelor într-un mARN şi terminalizează lanţurile polipeptidice. Cînd într-o genă dată au loc schimbări sau mutaţii, care constau în schimbarea succesiunii normale a nucleotizilor, se schimbă şi structura codului mARN, ca urmare tripletele de baze, denumite codoni missens, vor semnifica alţi aminoacizi. Datorită mutaţiilor genice majoritatea proteinelor mutante au efecte dăunătoare sau chiar letale. Proteinele mutante tolerate de sistemele genetice în care apar, în unele situaţii rare, pot contribui la sporirea capacităţii de adaptare la condiţiile de mediu.

O genă de mărime medie conţine 900 perechi de nucleotizi (obişnuit între 600 şi 1800), care sînt subîmpărţite în 300 codoni (triplete de baze) ce codifică lanţuri polipeptidice alcătuite din 300 de aminoacizi (obişnuit între 200 şi 600). Aşadar, un raport nucleotizi: aminoacizi de 3 : 1. În funcţionarea unei anumite celule participă un număr imens de proteine (la plante şi animale au fost identificate peste 100 000 proteine diferite), care, adesea, acţionează ca enzime sau catalizatori biologici ce controlează numeroasele şi diversele reacţii chimice produse simultan în interiorul fiecărei celule. Alături de acizii nucleici, proteinele sînt constituenţii chimici cei mai importanţi ai celulei, substratul material al tuturor caracteristicilor unui organism. Substanţele proteice cu

activitate catalitică sînt principalele răspunzătoare pentru totalitatea caracteristicilor unei celule oarecare la un moment dat și în anumite condiții de mediu.

Celula-ou conține codificată informația genetică (genotipul) pentru totalitatea caracteristicilor viitorului organism. Aceste caracteristici se realizează în cursul vieții individuale odată cu citodiferențierea morfologică și fiziologică a celulei și țesuturilor, fiind rezultatul interacțiunii materialului genetic cu condițiile de mediu în care se dezvoltă organismele.

Fenotipul. În urma interacțiunii dintre genotip și mediu rezultă fenotipul care reprezintă totalitatea caracteristicilor sau proprietăților unui organism la un moment dat, observate sau detaliate prin diverse mijloace (dimensiuni, comportare, formă, culoare, funcții fiziologice, compoziție chimică, structură internă și externă, macroscopică și microscopică etc.). Rezultă că la o plantă sau animal, inclusiv la om, se recunoaște doar fenotipul indivizilor. Spre deosebire, pentru cunoașterea genotipului este necesară cercetarea comportării indivizilor proveniți din aceeași părinți în 3—4 generații succesive, în condiții de creștere similare. Dacă indivizii descendenți cu aceeași origine dezvoltă în diverse generații același fenotip, cînd sînt crescuți în aceleași condiții de mediu, înseamnă că și genotipul este același pentru toți indivizii. În acest caz, fenotipul, prin totalitatea caracteristicilor sale, reprezintă genotipul cu majoritatea genelor sale.

Reproducerea și structura genotipului. Au o stabilitate mare a eredității genotipurile cu o structură homozigotă. O asemenea structură se realizează de organismele care se reproduc sexuat prin autofecundare. Astfel, plantele autogame, cum sînt: mazărea, orzul, grîul, tomatele etc., care se polenizează cu polen propriu în mod natural, produc descendenți genetic puri sau homozigoți (linii pure). La plantele alogame: porumb, sfeclă, floarea-soarelui, ceapă etc., care în mod natural se polenizează cu polen străin, genotipul este impur sau heterozigot. În scopul obținerii la organismele alogame a unor descendenți homozigoți este necesar să se realizeze o polenizare controlată, artificială, cu polen propriu. Acest proces se numește consangvinizare. După 4—5

consangvinizări succesive, la organismele alogame se obțin genotipuri pure numite linii consangvinizate. Înmulțirea vegetativă la plante, ca și fisiunea binară sau diviziunea directă la bacterii asigură prezervarea genotipului și obținerea unei descendențe uniforme genetic. Descendența rezultată prin înmulțire asexuată, dintr-un singur individ (care are același genotip), a primit denumirea de clonă (sușă).

Înmulțirea sexuată autogamă ca și consangvinizarea la alogame favorizează homozigoția, în timp ce fecundarea încrucișată favorizează heterozigoția.

Apariția și evoluția geneticii. Înțelegerea fenomenelor genetice este înlesnită de cunoașterea structurilor și diviziunilor celulare. Să analizăm, de exemplu, celula-zigot diploidă la mazăre care are 7 perechi de cromozomi (sau $2n = 14$ cromozomi). Zigotul rezultă prin unirea la fecundare a doi gameți haploizi (sau $n = 7$ cromozomi), produși prin diviziune reducțională (meioză) în aceeași floare (deci gamet femel ♀ $n = 7$ + gamet mascul ♂ $n = 7$ = zigot $2n = 14$ cromozomi). Fiind autogamă, mazărea are un genotip homozigot. Deci, dacă considerăm o caracteristică ereditară, de exemplu, „bob neted", înseamnă că în unul dintre cei 7 cromozomi, la un anumit locus, se va găsi varianta genei sau alela[1] pentru bob neted. simbolizată de pildă cu *A*. Rezultă că în gameții haploizi (cu un singur membru în cromozom — stare numită hemizigoție — se va găsi o singură alelă *A*, iar în zigotul diploid (cu doi membri homologi în fiecare cromozom, unul de origine maternă, altul de origine paternă) vor exista două alele identice *AA* (homozigoție). La locusul pentru forma bobului au apărut prin mutație și alte alele, de exemplu, „bob zbîrcit", simbolizată *a*.

Dacă, așa cum a făcut, în 1865, Gregor Mendel, părintele geneticii, cele două genotipuri homozigote se încrucișează experimental: „bob neted" *AA* x „bob zbîrcit" *aa*, în prima generație hibridă, F_1, cu structura genotipică heterozigotă *Aa* se manifestă caracteristica „bob neted" care este domi-

[1] Alele — forme alternative — alelomorfe — ale unei gene apărute în urma mutațiilor. Alela originară, nemutantă, numită de „tip sălbatic", este indicată cu simbolul +, de exemplu a^+, alelele mutante dominante cu majusculă, de exemplu, A, iar alelele mutante recesive cu minuscule, de exemplu *a*.

nantă față de caracteristica „bob zbîrcit" rămasă ascunsă, fiind recesivă. Prin autopolenizarea plantelor din F_1 care produc în aceeași floare gameți femeli și masculi de două tipuri: *A* și *a*, în proporții egale, în urma fecundării întîmplătoare a celor două grupuri de gameți rezultă generația F_2, care este heterogenă genotipic și fenotipic: se formează 3 genotipuri = 1/4 *AA* : 2/4 *Aa* : 1/4 *aa* și 2 fenotipuri = 3/4 „bob neted" (1/4 *AA* + 2/4 *Aa* sau 3/4 *A*.): 1/4 „bob zbîrcit" (1/4 *aa*). Separarea în meioză a celor două alele *A* și *a* și apariția în F_2 a ambelor fenotipuri, „neted" și „zbîrcit", se numește „segregare".

Mendel a avut curiozitatea studierii descendenței hibride și în cazul încrucișării unor plante de mazăre cu structură homozigotă deosebită și prin două (dihibridare), trei (trihibridare) sau mai multe perechi de caracteristici contrastante (alelomorfe). Astfel, a încrucișat un soi cu „bob neted" „galben", cu altul cu „bob zbîrcit" „verde". În prima generație hibridă a observat că toate boabele erau „netede" și „galbene", de unde concluzia că genele — alele pentru aceste caracteristici sînt dominante, iar cele pentru boabe „zbîrcite" și „verzi" sînt recesive. Pe baza acestei constatări el a simbolizat genotipul părinților *AABB* și *aabb*, iar dihibridul F_1*AaBb*. Datorită separării sau segregării alelelor dominante și recesive și unirii întîmplătoare a acestora (în diviziunea meiotică) dihibridul F_1*AaBb* produce 4 grupe de gameți femeli și masculi: *AB*, *Ab*, *aB*, *ab*. Din fecundarea acestora rezultă generația hibridă F_2 alcătuită din 4 fenotipuri: două parentale *A.B.* în proporție de 9/16 (dominante) și *aabb* în proporție de 1/16 (recesive) și două combinații noi de gene *A.bb* și *aaB.*, fiecare în proporție de cîte 3/16 (primele cu o dominantă și o recesivă, secundele cu cealaltă dominantă și cu cealaltă recesivă).

Analiza rezultatelor experimentale i-a permis lui Mendel să formuleze trei concluzii, ridicate ulterior la rangul de legi ale eredității. Astfel, în cazul cînd a folosit două soiuri de mazăre homozigote, deosebite printr-o singură pereche de caracteristici (monohibridare), pe baza cercetării primei generații hibride a desprins „legea uniformității primei generații hibride, F_1, datorită dominanței și recesivității". Cercetarea generației secunde l-a condus la descoperirea „legii segregării sau disjuncției genelor în generația a doua hibridă, F_2" (datorită separării sau segregării alelelor dominante și recesive în meioza hibridului F_1 și unirii întîmplătoare a gameților pentru formarea generației F_2.)

Aceste două legi ale eredității se manifestă și în cazul dihibridării sau polihibridării unor genitori la care între alelele aceleiași gene (*Aa Bb* sau *Aa Bb Cc*) se manifestă dominanță și recesivitate. În plus, în aceste situații (dihibridare, trihibridare etc. la mazăre, de unde denumirea de hibridare de *tip Pisum*) se manifestă în F_2 și „legea combinării libere a genelor sau segregarea independentă a caracteristicilor". Ea are la bază segregarea și combinarea liberă a genelor (în gameți și meioză, datorită faptului că perechile de gene implicate în polihibridare se comportă independent deoarece fiecare este localizată, într-un cromozom deosebit) și fecundării (în urma autopolenizării) întîmplătoare a gameților produși de F_1. Ca urmare, în F_2, rezultă unele combinații noi de gene, de exemplu, apariția alături de combinațiile parentale *AABB* și *aabb* și a combinațiilor noi de gene *AAbb* și *aaBB*.

Data apariției și începutul geneticii ca știință este anul 1900, cînd, în mod independent, H. de Vries, C. Correns și E.v. Tschermak, pe baza unor cercetări proprii, au redescoperit legile eredității formulate cu 35 de ani înainte de Mendel. Termenul „genetică" a fost introdus de biologul N. Bateson, în 1905, iar noțiunile de genă, genotip și fenotip de W.L. Johannsen, în 1909.

La dezvoltarea geneticii ca știință, alături de mendelism sau „teoria factorilor ereditari", un aport esențial l-au avut „teoria mutațiilor", elaborată de H. de Vries (publicată în 1901) și „teoria cromozomică a eredității" (morganismul) elaborată începînd cu 1910, de T. H. Morgan și colaboratorii săi C.B. Bridges, A.H. Sturtevant și H.J. Muller. Aceștia au analizat, pe de o parte, mecanismul genetic al variabilității la organismele vii și, pe de altă parte, caracteristicile structurii materiale pe care se sprijină mecanismele eredității. Ei au folosit tehnici moderne de laborator și un obiect de cercetare cu însușiri excepționale, musculița de oțet, *Drosophila melanogaster* (nepretențioasă, mică, cu ritm rapid de reproducere, prolificitate ridicată, caracteristici ereditare ușor vizibile, determinate de mutații genice, cu puțini cromozomi, $2n = 8$). Cercetările realizate pe *Drosophila* au permis con-

statarea că genele sînt particule materiale localizate în cromozomi, aranjate în ordine liniară de-a lungul cromozomilor ca mărgelele într-un șirag. Distanțele relative dintre gene pot fi stabilite prin hibridări experimentale, fapt ce permite să se întocmească hărți ale cromozomilor la diverse specii. Morgan și școala sa au stabilit că genele nu sînt întrutotul independente, cum observase și crezuse Mendel, ci ele au tendința de a rămîne unite, cuplate, pe parcursul generațiilor, formînd „grupe de legătură" sau „grupe linkage", care citologic corespund cromozomilor. Astfel, la *Drosophila*, cele 4 grupe linkage corespund celor 4 perechi de cromozomi, bacteria *Escherichia coli* care populează intestinul uman avînd un singur cromozom (fiind haploidă ca și virușii) are un singur grup linkage, iar omul (cu $2n = 46$ cromozomi, în gameți $n = 23$ cromozomi) are 23 de grupe linkage, mazărea ($2n = 14$, $n = 7$) are 7 grupe linkage, porumbul, ($2n = 20$; $n = 10$) are 10 grupe linkage, vaca ($2n = 60$; $n = 30$) are 30 de grupe linkage etc. Opus tendinței generale după care grupele linkage sînt transmise ca atare, înlănțuite ca la părinți, este fenomenul de crossing over care constă în schimbul de gene-alele între cromatidele ne- surori ale cromozomilor homologi (în meioză). Datorită acestui schimb, care este un proces normal, rezultă recombinări de gene numite crossovere ce asigură repartizări noi diferențelor ereditare între indivizii unei specii.

Teoria morganistă consideră că gena își păstrează stabilitatea prin autoreproducere printr-un proces de copiere. (Muller afirmă: „gena este o copie a copiei după copie multiplicată de mii de ori"). Ocazional, însă statistic previzibil, gena se schimbă prin mutație, dînd naștere unui nou tip de genă-alelă, care se va autoreproduce în forma sa schimbată, deoarece schimbarea sau mutația genei este ireversibilă. Fenomenul mutației genice a fost cercetat și indus (produs) experimental cu ajutorul razelor X (care intensifică frecvența mutației; la baza mutației stă o schimbare de natură chimică în ADN din genă). Analiza complexă a eredității prin hibridarea experimentală a unor mutanți de tipuri diferite, prin inducerea de schimbări în structura unor gene și relevarea prin așa-numite „test crossuri" (încrucișarea controlată a descendenților dihibrizi sau trihibrizi F_1 cu părintele recesiv),

a regrupării genelor-alele dintr-un cromozom prin crossing over, i-a permis lui Morgan să formuleze ideea că: „gena reprezintă în același timp o unitate de funcțiune, de mutație și de recombinare".

Rezultă că fundamentarea geneticii ca știință s-a bazat pe cercetarea mecanismelor eredității cu ajutorul hibridărilor experimentale (care au relevat atît comportarea genelor independente, cît și a genelor linkage), a analizelor statistice, a studiului microscopic al structurilor și diviziunilor celulare și a controlului de către gene a caracteristicilor ereditare, precum și a rolului mutației genice, a aberațiilor structurale cromozomale și a schimbărilor în numărul de cromozomi, în inducerea variabilității genetice etc.

Un avînt uriaș a cunoscut cercetarea fenomenelor genetice după descoperirea de O.T. Avery și colaboratorii săi, în 1944, a rolului ADN în ereditate, care a determinat nașterea „geneticii moleculare". Aceasta s-a îmbogățit rapid cu alte descoperiri remarcabile: stabilirea structurii macromoleculei de ADN (J. Watson, F. Crick, M. Wilkins, în 1953), realizarea biosintezei artificiale a ARN celular (M. Grunberg-Manago și S. Ochoa, în 1955), punerea în evidență a ribozomilor și a rolului acestora în sinteza proteinelor (G. Palade, american de origine română, laureat al Premiului Nobel și alții, în 1955), sinteza ADN dirijată de ADN (A. Kornberg, în 1956), descifrarea codului genetic (S. Ochoa, W. Nirenberg și alții, între 1961—1967), descoperirea reglajului genetic (S. Benzer, în 1958; F. Jacob și J. Monod, în 1961), prezicerea existenței și evidențierea ARN mesager (mARN, de J. Monod, și F. Jacob, în 1961; J. Hurwitz și J. Furth, în 1962), izolarea genei (J. Backwith și colaboratorii săi, în 1969), sinteză artificială a unei gene (G. Khorana, în 1970), sinteza ADN dirijată de ARN (H. Temin, în 1972), prima manipulare genetică (C.R. Merrill și colaboratorii săi, în 1971) și multe altele.

Cu toată vîrsta relativ tînără, datorită descoperirilor înregistrate, a metodelor și obiectelor de cercetare utilizate, din punct de vedere istoric, genetica a evoluat de la etapa denumită *genetica clasică* (începînd cu 1900), la etapa *geneticii moderne* (după 1944). O dată cu evoluția cunoștințelor s-au înmulțit tot mai mult posibilitățile de control a mecanismelor eredității, a sporit eficiența intervențiilor ce urmă-

reau schimbarea dirijată a plasmei germinative, s-au îmbunătăţit şi perfecţionat tehnicile de modelare în *vivo* şi în *vitro* a unor genotipuri cu structuri şi funcţii noi comparativ cu tipurile parentale.

AGRICULTURA — ÎNTRE GENE ŞI PÎINE

Soiul controlează volumul şi valoarea producţiei

În modernizarea şi progresul dinamic al agriculturii, la perfecţionarea tehnologiilor agricole, un rol covîrşitor îl are cercetarea ştiinţifică. Alături de însemnata cantitate de cercetare aplicativă desfăşurată, cu efecte pozitive recunoscute asupra progresului tehnologiilor agricole, au fost cercetate şi unele probleme importante de genetică, dintre care o semnificaţie aparte o are activitatea de dezvoltare a variabilităţii genetice şi de creare a unor genotipuri, cu potenţial de producţie ridicat şi o valoare nutritivă superioară vechilor soiuri autohtone sau străine introduse[1].

Importanţa noilor soiuri şi hibrizi vegetali, cu capacitate de sinteză sporită, cu însuşiri mărite de rezistenţă la factorii poluanţi, stresanţi sau agresivi din mediul de cultură este recunoscută aproape unanim, atît de cercurile de specialişti, cît şi de cei care programează resursele vieţii (ecologi, economişti, politicieni etc.). Creşterea în ansamblu a producţiei diferitelor specii vegetale cultivate, care în ultimele două-trei decenii s-a dublat sau triplat, într-o serie de ţări, inclusiv în România, se datorează în mare măsură soiurilor şi hibrizilor noi.

Se poate afirma că agricultura a progresat de la etapa tradiţională la o agricultură intensivă, în primul rînd pentru că printre mijloacele utilizate şi anume: îngrăşăminte chimice, maşini agricole, pesticide (erbicide, insecticide, fungicide), apă pentru irigarea culturilor au fost incluse soiuri şi hibrizi

---

[1] Crăciun, T. *Genetica — ramură de bază a agriculturii moderne.* în: *Probleme ale agriculturii contemporane,* Edit. CERES, 1977, Bucureşti.

de înaltă productivitate. Analiza acestor mijloace de intensivizare a procesului de producţie agricolă reliefează faptul că *singurul element care are capacitatea de a transforma energia, cheltuielile ş.a. în producţie concretă este soiul sau hibridul vegetal.* Rezultă că în ultimă instanţă volumul şi valoarea producţiei agricole sînt controlate tocmai de materialul biologic utilizat, mai concret, de genotipul sau constelaţia de gene a soiului sau hibridului cultivat. Cînd genotipul este superior, investiţiile în tehnologie, în pregătirea substratului etc., devin eficiente economic; cînd genotipul este inferior orice investiţie în tehnologie are eficienţă economică limitată. Dacă potenţialul ereditar al soiului asigură sinteza unei producţii de 2 500 kg/ha, un mediu optim de cultură pentru specie, abia dacă poate determina un plus de recoltă de 20—25%. Fără nici o altă intervenţie, acelaşi mediu de cultură, exploatat de un soi cu potenţial biosintetic sporit genetic, poate realiza o producţie dublă sau chiar mai mare.

Un progres continuu al agriculturii presupune asigurarea pentru soiurile şi hibrizii cultivaţi a unor condiţii de mediu optime care să asigure transformarea potenţelor genotipurilor utilizate în realitate. Între aceste două laturi ale culturii plantelor există un raport dialectic, fapt ce trebuie să se oglindească şi în repartizarea fondurilor, pe de o parte în cercetarea aplicativă menită să contribuie la perfecţionarea tehnologiilor de cultură şi îmbunătăţirea substratului pentru creşterea plantelor şi sporirea producţiilor, iar pe de altă parte în cercetarea fundamentală, de genetică, pentru cunoaşterea mecanismelor eredităţii, a resurselor de variaţie genetică naturală şi indusă experimental, a metodelor actuale şi de perspectivă de manipulări genetice, a modalităţilor perfecţionate de înmulţire şi prezervare a genotipurilor etc.

Se poate spune că în ţara noastră, în ultimele trei decenii, cercetărilor aplicative le-a fost acordată atenţia şi importanţa cuvenite. Au fost înfiinţate institute, staţiuni, laboratoare avînd sarcina să cerceteze solul, protecţia plantelor, mecanizarea, irigarea, cultura cerealelor şi plantelor tehnice, a cartofului, sfeclei de zahăr, legumelor, pomilor, viţei de vie, tutunului etc. În aceste instituţii s-au obţinut realizări ştiinţifice însemnate, care contribuie la permanenta perfecţionare a tehnologiilor de cultură, cu utilizarea unor cantităţi cît mai rezonabile şi raţionale de substanţe chimice şi

apă, care să asigure plantelor o creștere și o nutriție cît mai bună, și pe cît posibil o sporire a producției și productivității.

În domeniul cercetărilor de genetică, pentru agricultură s-au făcut unele eforturi și au fost obținute diverse realizări însă nu la nivelul cerințelor. Din această cauză, la Congresul al II-lea al țărănimii (din februarie 1981), tovarășul Nicolae Ceaușescu, secretar general al P.C.R. a arătat: „Pornind de la serioasele rămîneri în urmă în domeniul cercetării genetice și biologice, este necesar să se organizeze un program care să mobilizeze toate forțele existente în aceste domenii, în vederea intensificării activității pentru rezolvarea unor probleme teoretice și practice de cea mai mare importanță pentru modernizarea agriculturii noastre și ridicarea randamentului producției agricole, vegetale și animale".[1]

La rămînerea în urmă a cercetărilor de genetică, așa cum a arătat tovarășul Nicolae Ceaușescu la consfătuirea de lucru de la C.C. al P.C.R. din 19—20 august 1982, a putut contribui și faptul că: „Cercetarea noastră are un limbaj prea general: ameliorarea. Cred că trebuie să precizăm : e vorba de a produce noi soiuri de semințe și ameliorarea celor existente."[2]

Crearea de noi soiuri și rolul crescînd al cercetărilor de genetică în acest complex proces necesită centralizarea eforturilor într-un institut de genetică vegetală sau în secții specializate numai pentru astfel de cercetări, în institutele de cercetare a tehnologiilor de cultură a diverselor specii cultivate funcționînd la ora actuală secții și laboratoare de ameliorare a plantelor cu rezultate strălucite.

Acțiunea de producere și înmulțire a semințelor și a materialului săditor revine practic, tot cercetătorilor amelioratori. În aceste condiții, în anumite momente, una dintre laturi poate precumpăni asupra celeilalte producînd neajunsuri. Pentru evitarea acestora, la consfătuirea de lucru menționată, tovarășul Nicolae Ceaușescu, menționînd că în cercetarea agricolă avem aproape 8 000 de oameni, face precizarea:

[1] Ceaușescu N., *Cuvîntare la Congresul al II-lea al consiliilor de conducere ale unităților agricole socialiste, al întregii țărănimi, al consiliilor oamenilor muncii din industria alimentară, silvicultură și gospodărirea apelor*, 19 II, 1981, pag. 30., Edit. Politică, București 1981.

[2] Ceaușescu N., *Cuvîntare la Consfătuirea de lucru de la C.C. al P.C.R*, Scînteia, nr. 12440, 21 VIII, 1982.

„Trebuie să-i punem să lucreze pe domenii, pe grupe de probleme — și să soluționăm rapid problema producerii semințelor și materialului săditor de înaltă productivitate, rezistent la boli, la tot ceea ce se cere. Dacă nu facem aceasta înseamnă că nu facem cercetare, facem acțiune de înmulțire a semințelor"[1].

Producerea unei semințe cu caracteristicile valoroase menționate și nu simpla „înmulțire a semințelor" presupune cercetarea aspectelor teoretice, metodologice și practice ale acestei importante acțiuni. Lipsa unei semințe valoroase influențează negativ producția agricolă.

În țara noastră culturile de cereale în anii 1960 și 1979 au ocupat 79, respectiv 91% din suprafața arabilă a țării. În acest interval, producția de cereale boabe a crescut de aproape două ori (la 197%): la grîu și secară producția medie a crescut de la 21,1 la 22,0 q/ha, iar la porumb de la 15,5 la 37,2 q/ha. Progresul culturii cerealelor în acești 20 de ani este evident. Să analizăm evoluția producției cerealelor pe ultima perioadă a intervalului și anume între 1976 și 1979[2].

În anii 1976 și 1979 cerealele au ocupat aproximativ aceleași suprafețe: 6 350,6, respectiv 6 320,0 mil.ha (din care: grîu + + orz — 2 838,6, respectiv, 2 913,6 mil.ha, iar porumb — 3 377,6, respectiv, 3 311,3 mil.ha) și au realizat, practic, aceleași producții totale: 19 791,0, respectiv, 19 337,2 mil.t. În aceeași perioadă producția medie anuală a fost la grîu 26,3 q/ha (28,8 q/ha în 1977 și 22,0 q/ha în 1979), la orz 29,9 q/ha, iar la porumb 33,6 q/ha (cu 30,4 în 1977 și 37,2 q/ha în 1979). Dar, per total agricultură, în 1979, față de 1975, cantitatea (în substanță activă) de îngrășăminte chimice folosite, ca și cantitatea antidăunătorilor fabricați, a crescut cu cîte 31%, a tractoarelor fizice cu 16%, suprafața amenajată pentru irigat destinată culturii grîului cu 26%, iar pentru porumb boabe cu peste 45% etc. În aceeași perioadă[3], nu a fost omologat nici un soi nou de orz, au fost omologate 7 soiuri de grîu de toamnă (din 21 cultivate) și 7 hibrizi

[1] Ceaușescu N., *Cuvîntare la Consfătuirea de lucru de la C.C. al P.C.R.*, ibidem.

[2] *Anuarul Statistic al R.S.R.*, București, 1980.

[3] Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare: „Lista oficială a soiurilor și hibrizilor de plante agricole pentru cultură în Republica Socialistă România", București, 1980.

(din grupele F.A.O. peste 300; din 22 recomandați pentru producție, în 1980).

Din compararea acestor date reiese că, pe termen lung, între 1960 și 1979 producția de cereale aproape s-a dublat. În perioada 1976—1979 cu toate investițiile în îngrășăminte chimice și antidăunători, în tractoare și mașini agricole, în amenajări de suprafețe pentru irigații etc., alături de unele condiții climatice mai puțin favorabile și unii factori subiectivi, printre cauzele care au plafonat producția cerealelor trebuie incluse și unele soiuri și hibrizi cu caracteristici productive și adaptive mai puțin valoroase, dar cu precădere calitatea mai scăzută a semințelor folosite de unitățile de producție.

Pentru a releva rolul soiurilor și hibrizilor valoroși în sporirea producției să analizăm cîteva date experimentale obținute de I.C.C.P.T.-Fundulea și de Comisia de Stat pentru Încercarea Soiurilor (C.I.S.)[1]. La grîu, la lucrări identice ale solului, fără îngrășăminte chimice, în medie pe 3 ani (1975—1977) soiurile Lovrin 10 și Ceres au realizat producții practic egale: 24,4, respectiv, 26,3 q/ha: la adăugarea, pe fondul de 60 Kg/ha P_2O_5, a unor doze optime de N — azot (12o, respectiv, 110 Kg/ha), producțiile celor două soiuri cresc la 39,8 respectiv, 50,8 q/ha. Înseamnă că două soiuri cu potențialități egale la cultura fără îngrășăminte reacționează cu totul deosebit la administrarea îngrășămintelor: primul produce 12,8 kg boabe la un KgN administrat, al doilea 22,2 kg boabe/kg N administrat. În bani, la 1 leu cheltuit cu îngrășăminte, primul soi aduce un venit net de 1,30 lei, al doilea, mai mult decît dublu, 2,75 lei. Este clar că în zona Fundulea soiul Ceres este mult mai potrivit în cultură comparativ cu soiul Lovrin 10.

Să urmărim comportarea soiului Ceres în alte localități, Arad și Peciu Nou: în 1976, an favorabil culturii grîului, a produs 53,2, respectiv, 55,0 q/ha. În aceleași cîmpuri experimentale soiul Sava (cu o perioadă de vegetație și calitate, practic, egale a produs 55,0, respectiv, 72,1 q/ha. Se desprinde că soiul Ceres manifestă aproximativ aceeași capacitate de biosinteză în cele două centre (cu o diferență nesemnificativă), în timp ce soiul Sava reacționează adaptiv la modificările mici, pozitive, ale condițiilor pedoclimatice, sporindu-și sensibil biosinteza, concretizată într-un spor de 17,1 q/ha sau 131% (la Peciu Nou față de Arad).

[1] Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare: „Rezultate ale încercării soiurilor de plante agricole", București 1977.

Rolul diferențiat al genotipului în folosirea măsurilor agrofitotehnice se evidențiază, adeseori, mai pregnant la porumb. De exemplu, în perioada 1974—1976, hibrizii de porumb HS 400 și HS 415 s-au dovedit cei mai productivi în cîteva cîmpuri experimentale din Dobrogea. Astfel, la fertilizarea cu 64 Kg/ha P_2O_5 și 96 Kg/ha N, în condiții de neirigare, la Mihail Kogălniceanu (Tulcea) cei doi hibrizi au realizat în medie producții de 55, respectiv 47 q/ha, iar în condiții de irigare, ambii hibrizi au realizat în medie 100 q/ha. Se poate deduce influența pozitivă a irigării, dar și faptul că hibrizii pot reacționa la fel sau diferit la aplicarea acestui mijloc agrofitotehnic care poate dubla producția de porumb.

Din aceste exemple, și ele pot fi nenumărate, se poate desprinde un fapt esențial și anume că dintre toate mijloacele de producție utilizate în cultura plantelor soiul sau hibridul folosit are o importanță aparte în constelația de factori care concură la realizarea producției. În condiții pedoclimatice identice, la același nivel al fertilizării și al lucrărilor de întreținere, un genotip superior se remarcă printr-o capacitate de adaptare mai mare reflectată în utilizarea mai eficientă a elementelor tehnologiei și realizarea la unitatea de suprafață a unor producții superioare.

STRATEGIILE CLASICE DE AMELIORARE A PLANTELOR

În ultimii 20—25 de ani agricultura a beneficiat substanțial de importantele descoperiri ale geneticii clasice. Astfel, pe lîngă contribuția teoretică care a permis explicarea fenomenelor de reproducere, de ereditate și de variabilitate, cercetările de genetică au fundamentat științific bazele teoretice ale producției agricole prin:

— precizarea faptului că fenotipul sau ceea ce este recoltat reprezintă rezultatul interacțiunii genotipului cu condițiile de mediu concrete;

— elaborarea premiselor dezvoltării unei agriculturi intensive în sensul perfecționării eficienței metabolismului;

— stabilirea reacției gazdă — patogen, identificarea mecanismelor rezistență — susceptibilitate la condițiile mediului;

— crearea unor soiuri noi, mai productive, de calitate și mai rezistente la condițiile nefavorabile din mediu.

Cercetările de genetică au influențat într-un mod spectaculos activitatea de ameliorare, mai ales a plantelor anuale cu reproducere generativă și a plantelor perene cu reproducere obișnuit vegetativă.

Obținerea genotipurilor noi la plantele autogame

Grîul, orezul, orzul, fasolea, mazărea, tomatele, tutunul, arahidele, sorgul, bumbacul etc. sînt autogame. Aceste plante au flori hermafrodite în care se produc atît gameți femeli cît și masculi, care se fecundează în cadrul florii (se autofecundează). Adaptarea florii la un regim de reproducere autogamă, cu participarea la fecundare a unor gameți cu nuclei identici, face ca structura genetică a descendenților în generații succesive să atingă un nivel înalt de homozigoție.

Autogamia favorizează homozigoția și restrînge treptat heterozigoția cu o rată de 50% pe generație care poate surveni în urma unor fecundări întîmplătoare încrucișate (în condiții de secetă) cu polen produs de alte plante deosebite genetic sau a unor mutații genice spontane. Din aceste motive populațiile autogame naturale sînt alcătuite din mai multe genotipuri homozigote (populațiile sînt heterogene genotipic, iar indivizii sînt homozigoți). Indivizii dintr-o populație care au un genotip identic și se prezintă sub o formă perfect omogenă alcătuiesc o „linie pură" (descendența rezultată dintr-un singur individ la o specie autogamă prin autogamie strictă). Înseamnă că orice individ dintr-o linie pură poate să reproducă structura genetică și caracteristicile

plantei mamă, și a liniei întregi, deoarece au alele identice la toți locii (de exemplu AA sau aa, BB sau bb, CC sau cc etc.).

După elaborarea „teoriei liniei pure" de către genetistul danez Johannsen, în 1903, extragerea de linii pure din populații a devenit principala metodă aplicată în ameliorarea speciilor de plante autogame și este cunoscută sub denumirea de „selecție individuală". Potrivit acestei metode aplicabilă numai în populațiile naturale ale speciilor autogame heterogene genetic, dar constituite din genotipuri homozigote, prin selecția și înmulțirea autogamă a unui singur individ valoros se obține după o singură generație o descendență (linie pură) identică. Liniile pure sînt diferite, mai mult sau mai puțin una de alta. Aceste diferențe sesizabile sau insesizabile fenotipic pot afecta caracteristici cum sînt: greutatea, mărimea, forma și culoarea semințelor, fructelor, florilor sau a unor organe vegetative, durata perioadei de vegetație, compoziția chimică, rezistența la temperaturi excesive, la rasele unor specii de boli și insecte, capacitatea de sinteză și altele. Prin aplicarea selecției individuale s-au obținut numeroase soiuri, care, în realitate, sînt linii pure, a căror descendență este perfect omogenă. Asemenea soiuri nu segregă și au o mare stabilitate și puritate genetică. Acestea sînt avantaje enorme pentru înmulțirea semințel, dar și pentru agricultura intensivă și societatea actuală care pretind uniformitate pentru formele cultivate. Uniformitatea soiurilor în privința fenofazelor, a mărimii semințelor, fructelor sau organelor vegetative, a calității, culorii etc., este cerută de mecanizarea completă a lucrărilor de întreținere și recoltare, de industria alimentară și de comerț, precum și de consumatori.

Inducerea variabilității. Selecția individuală aplicată în populațiile autogame a redus mult heterogenitatea acestora. Dar cauza majoră care a redus sursa de variabilitate la speciile autogame cultivate a fost eliminarea populațiilor locale din cultură de marile întreprinderi agricole. Acestea, prin eliminarea micilor producători, datorită folosirii unor tehnologii bazate pe mecanizare și comercializarea produselor, au impus puține soiuri ameliorate, evident mai productive, în

detrimentul vechilor soiuri și populații locale, mai adaptate dar mai puțin productive.

Așa se face că sărăcirea speciilor cultivate în resurse genetice a devenit dramatică.

Caracteristicile ereditare, aparent inutile, eliminate de-a lungul mileniilor, cu deosebire de selecția intensă din ultimele 6—7 decenii, dar mai ales de agricultura comercială sau „industria agricolă" riscă să devină indispensabile în viitorii 10—20 de ani, cînd va trebui să fie create noi soiuri de plante (și rase de animale) mai bine adaptate nevoilor noastre și condițiilor de mediu. Acest fapt, ca și necesitatea obținerii unor soiuri cu însușiri ereditare tot mai bune, a adus la ordinea zilei, pentru speciile autogame, ca de altfel pentru toate speciile cultivate sau create de om problema creării unei variabilități artificiale.

S-a menționat că soiurile speciilor autogame sînt linii pure, deci genotipul indivizilor este homozigot. Heterozigotarea acestora și inducerea variabilității se realizează prin două categorii de intervenții: mutageneză indusă și hibridare intraspecifică.

Mutageneza artificială. În acest caz se intervine direct asupra unui genotip, urmărindu-se fie variația (schimbarea) structurii genelor (mutația genei) sau structurii cromozomilor (dislocația cromozomală: duplicație, translocație etc.), fie variația numărului cromozomilor (ploidia: euploidia și aneuploidia). Pentru inducerea mutației genice și a dislocațiilor cromozomale, linii pure sau hibrizi, sînt supuse influenței unor agenți cum sînt radiațiile (X, gamma, neutroni etc.), unele substanțe chimice (etil metan sulfonat — EMS, baze azotate rare, ADN exogen etc.). Doza de radiații, de EMS și de alți agenți cu efecte biologice nocive este apropiată de doza letală 50 (DL 50), cu capacitatea de a omorî 50% din efectivul tratat (celule, semințe, muguri, plante etc., diploide, $2n$ cromozomi sau haploide, n cromozomi). După tratament, printre descendenți pot fi detectați indivizi cu diferențe morfologice, fiziologice, biochimice, în vigoare, etc., față de genitori.

Selecția repetată, genealogică sau pedigree, care poate începe în $F_2(M_2)$, cînd apar primele plante segregante homozigote pentru alele mutante recesive, și poate continua pînă în M_5—M_7, a permis detectarea unor mutante, care, după fixare prin homozigoție, au pus bazele unor soiuri la diverse specii autogame de cereale, legume, leguminoase pentru boabe, flori etc.

Cu toate eforturile foarte mari depuse în multe laboratoare din diverse țări, numărul de soiuri create prin mutageneză este încă mic. Situația este explicabilă dacă se are în vedere faptul că tipul original al genelor și grupelor linkage de gene a fost echilibrat structural și funcțional de selecția naturală și, ca urmare, orice schimbare provocată brutal în informația genetică și structura cromozomilor are puține șanse de a nu fi dăunătoare sau letală pentru celula sau individul în care apare. Aceasta a impus ideea ca tratamentele cu agenți mutageni cu efecte nocive să se facă în doze cît mai mici și repetat și să fie extinsă folosirea, în vederea schimbării codului genetic a unor mutageni reprezentați de analogi ai bazelor azotate normale și ADN exogen.

Tratarea celulelor în plină diviziune, cu substanțe antimitotice, de exemplu, cu colchicină, induce variabilitate prin acumularea unor metafaze. Ca efect, numărul cromozomilor din celulă se dublează, astfel că, dacă inițial celula a fost diploidă, $2x$, cu doi genomi, AA sau BB, ea se autotetraploidizează devenind $4x$, cu patru genomi AAAA sau BBBB. În general, autopoliploizii au anomalii meiotice de aceea au o fertilitate redusă (autotetraploizii, iar autotriploizii, $3x$, AAA, sînt sterili).

Din această cauză autopoliploidia a jucat un rol minor în evoluția și ameliorarea speciilor sexuate (mai ales anuale). Artificial, au fost obținute genotipuri autotetraploide la tomate ($4x = 48$ cromozomi) care au fructe uriașe, la orz ($4x = 28$), salată ($4x = 36$) etc.

Hibridarea intraspecifică. În categoria secundă de intervenții pentru inducerea și extinderea variabilității la speciile autogame sînt incluse diversele forme de polenizare încrucișată controlată, urmată de aplicarea în generațiile segregante a selecției genealogice, pentru obținerea unor genotipuri homozigote (linii pure). În general, soiurile actuale cultivate din cele mai importante specii autogame sînt rezultatul cîtorva cicluri de interîncrucișări și selecție. În vederea hibridării se aleg genitori linii pure, cu caracteristici comple-

mentare, care sporesc șansa de a izola în generațiile segregante genotipuri care combină sau recombină genele dorite. Pentru aceasta, unul dintre genitori trebuie să reprezinte cel mai răspîndit tip agronomic cultivat, iar al doilea genitor (al treilea, al patrulea etc.) este ales în primul rînd pe baza capacității sale de a ameliora acele caracteristici ale primului genitor, care sînt sub cerințele standard necesare unei performanțe satisfăcătoare. Selecția, care începe în F_2, se repetă pînă se obține un genotip stabil (homozigot).

Pentru introducerea într-o anumită linie pură, în ansamblu valoroasă, a unei alele mutante de la o linie donor, cei doi genitori se încrucișează, apoi descendențele hibride se retroîncrucișează (backcrossează) cu recipientul după formula: [(A♀ — recipient sau recurent × B♂ — donor) × × A] × A_n.

Prin fiecare backcross descendența se apropie cu o rată de 50% de recipient, care-și păstrează genele proprii, minus alela necorespunzătoare care este substituită prin crossing over, de alela corespunzătoare de la donor (backrossul, autogamia și selecția elimină toate celelalte gene de la donor și homozigotează descendența).

Metoda hibridării intraspecifice a permis vehicularea diverselor gene — alele și, adeseori, concentrarea acestora în structuri genotipice mult superioare genitorilor, care, prin autogamie, se fixau în diverse linii pure — soiuri. Această modalitate relativ simplă: hibridare → autogamie → selecție, după un număr de cicluri, a contribuit la dezvoltarea unora dintre cele mai valoroase soiuri cultivate în prezent, de grîu, soia, ovăz, bumbac, in, mazăre, tomate, vinete, fasole, ardei etc.

Soiurile multiliniale. Autofecundarea ca modalitate naturală de înmulțire a plantelor autogame asigură homozigoția, iar selecția individuală în populații naturale sau artificiale separă indivizii homozigoți care pot pune bazele unor linii pure. Avantajele acestor soiuri unigenotipice sînt extraordinar de mari din punctul de vedere al mecanizării lucrărilor, al prelucrării și comercializării, precum și al gustului consumatorilor. Aceste trăsături valoroase ale soiurilor linii pure rezidă în omogenitatea genotipică a tuturor indivizilor care conferă soiului o uniformitate fenotipică remarcabilă.

Dar și slăbiciunile acestui tip de soiuri rezultă din puritatea genetică. La liniile pure homeostazia (proprietatea sau tendința organismelor vii de a stabiliza — diversele lor constante fiziologice, genetice etc., în raport cu factorii interni, externi etc.) este slabă din cauza bazei genetice foarte restrînse. Acest defect nu se manifestă într-o manieră foarte netă pentru adaptarea pedoclimatică, dar el devine flagrant în cazurile de susceptibilitate la o rasă parazitară foarte precisă.

Acest defect poate fi remediat prin crearea soiurilor multiliniale (compuse), care sînt mozaicuri de linii foarte apropiate genetic unele de altele (linii izogenice) în privința aptitudinilor agronomice și calităților tehnologice, dar a căror genotipuri diferă, totuși, pentru un număr oarecare de loci în care fiecare posedă altă alelă de rezistență pentru cele mai virulente rase fiziologice din principalele specii parazite care sînt preponderente în zona de cultură.

Concepția soiurilor multilineale pentru controlul bolilor epidemice răspîndite prin aer (rugini, făinare, mălură ș.a.), ca o replică a soiurilor linii pure a fost propusă de geneticștii N.F. Jensen (1952) și N.E. Borlaug (1959, laureat al Premiului Nobel pentru pace). Ultimul a obținut soiuri multiliniale rezistente la numeroase rase ale celor trei specii de rugini ale gramineelor (neagră, brună și galbenă).

Baza unui soi multilinial o constituie un soi linie pură, cu caracteristici agronomice foarte bune, adaptat condițiilor abiotice, dar despre care se știe că nu are, de exemplu, la grîu, alele de rezistență la rasele de rugini, care atacă în condiții favorabile în zona în care se cultivă (sau se va cultiva). Acest soi, va îndeplini rolul de părinte recipient și recurent (va fi backcrossat pentru reconstituire). În țara noastră, primul soi multilinial de grîu a fost constituit în anul 1978, din 15 linii izogenice diferite. Ca părinte recurent a fost folosită linia de grîu de toamnă de perspectivă Fundulea 26—67. Tehnica a constat în încrucișarea acestei linii, separat, cu diverse alte linii și soiuri care posedau rezistență la ruginile brună și neagră (unele și la rugina galbenă și septorioză; de exemplu, F 26 — 67 × Purdue 67136 B_1 — 3 — 1/3 sau F 26 — 67 × Agent / 3 etc.), apoi fiecare hibrid F_1 a fost încrucișat (backcrossat) cu linia F 26 — 67 (părinte recurent). Backcrossul a mai fost repetat de două ori [(F 26 — 67 × × Agent/3) × F 26 — 67) × 26 — 67)] × F 26 — 67 și

așa în cazul fiecărei surse de rezistență. Prezența rezistenței a fost examinată prin infecții artificiale, în fitotron și cîmp, cu rasele fiziologice de rugini endemice în zonă.

În fiecare descendență a hibrizilor „recurent" × „sursă de rezistență", cele trei backcrossuri au reconstituit linia F 26 — 67 (50% pe generație) în proporție de 93,75% (50 + + 25 + 12,5 + 6,25), iar autopolenizarea aplicată după backcross a homozigotat și ultimele procente (6,25% heterozigoție, datorită sursei — donor), asigurînd obținerea unor linii pure izogenice. Pe baza asemănării cu F 26 — 67 în privința caracteristicilor agronomice și a rezistenței la rasele diverselor specii de rugini și alte boli au fost reținute 15 linii din amestecul cărora a rezultat soiul multilinial. Acesta are toate caracteristicile liniei F 26 — 67, plus cîte 5 gene specifice, deosebite, de rezistență la rugina brună și rugina neagră, 3 gene de rezistență la făinare, o genă de rezistență la rugina galbenă etc. Soiul multilinial axat pe F 26 — 67, în condițiile unui an de cultură fără atac de rugini va avea o comportare identică cu linia pură F 26—67, dar într-un an cu atac de rugini, datorită rezistenței, va realiza o producție net superioară liniei recurente susceptibile la atac[1].

La orz, grîu, ovăz și alte specii de plante autogame, care ocupă suprafețe întinse supuse atacurilor endemice de rugini și alte boli cu răspîndire aeriană rapidă și în masă, culturile pot fi protejate prin crearea și folosirea soiurilor multiliniale. Din cauză că unele genotipuri din acest tip de soi pot fi mai competitive comparativ cu altele, iar acestea pot să nu fie cele mai productive sau de calitatea cea mai bună, după cîțiva ani succesivi de cultură proporția diverselor genotipuri se poate schimba, reducînd capacitatea de producție. Aceasta obligă ca liniile izogenice să fie înmulțite separat, iar amestecul pentru sămînța comercială să se facă în fiecare an sau la intervale scurte de timp. Datorită acestor limitări, legislațiile dintr-o serie de țări (de exemplu, din Franța), nu permit comercializarea unor asemenea amestecuri la o serie de specii.

---

[1] Ionescu-Cojocaru, M. *Un soi experimental multilinial de grîu de toamnă rezistent la ruginile brună și neagră.* În „Probleme de Genetică Teoretică și Aplicată", I.C.C.P.T. — Fundulea, Vol. XII, 6, 1980.

Hibridarea interspecifică. De la luarea lor în cultură, datorită mai ales linkage-ului strîns cu gene cu efecte negative, din speciile cultivate autogame au putut fi eliminate unele gene, implicate mai ales în controlul unor caracteristici de adaptabilitate la condițiile de mediu: rezistență la temperaturi excesive, negative sau pozitive, rezistență la boli, la dăunători etc. Susceptibilitate la factori agresivi pot manifesta speciile cultivate și în cazul extinderii arealului de cultură în zone cu totul noi cu biocenoze și biotopuri deosebite de cele de origine sau în cazul cînd în regiunea de baștină a speciei cultivate sînt introduse din alte regiuni specii mai virulente de dăunători. Genele pierdute sau lipsă din specia cultivată, care o expun unei agresiuni puternice din partea factorilor dăunători din mediul de cultură, pot exista însă în specii sau genuri mai mult sau mai puțin înrudite, cultivate sau sălbatice. Într-o asemenea situație, prin hibridare îndepărtată, se urmărește să se transfere în specia susceptibilă gena de rezistență de la specia donor. (În lipsa homologiei cromozomilor celor două specii schimbul de gene nu are loc prin crossing over, ci prin ruperea cromozomilor nehomologi și transferul genei dorite printr-o translocație reciprocă. Pentru ruperea cromozomilor, hibridul interspecific F1 se iradiază, apoi se aplică selecția și eventual backcrossul cu părintele recipient.)

Obișnuit, hibridările interspecifice, se realizează cu dificultăți datorită incompatibilității la fecundare a gameților străini din cauza mai ales a diferențelor în structura și numărul cromozomilor din nucleul haploid al acestora (al gameților). Dacă totuși fecundarea se poate produce în urma unor intervenții, adeseori, zigotul, embrionul sau sămînța nu sînt viabile, sau plantele au defecte în creștere care pot fi letale, sau plantele hibride îndepărtate sînt sterile. Unele din aceste dificultăți pot fi învinse prin tratarea hibridului interspecific cu genomii AB (zigot, sămînță, plantă) cu colchicină pentru dublarea cromozomilor și obținerea amfiploizilor (AABB, care în urma împerecherii în meioză a cromozomilor homologi A cu A și B cu B, sînt fertili amfiplozi).

În unele cazuri se urmărește transferul la specia cultivată doar a unei singure perechi de cromozomi de la specia străină, fie prin adiția unei perechi de cromozomi ($2n + 2$), fie prin substituție (cînd specia recipient, după ce în prealabil a fost

lipsită, controlat, de o anumită pereche de cromozomi, $2n-2$, primește de la donor o anumită pereche de cromozomi cu genele dorite, $2n-2+2=2n$).

Hibridarea îndepărtată, în vederea inducerii de translocații, este folosită la multe dintre speciile autogame cultivate. Astfel, în cromozomii grîului comun, *Triticum aestivum* ($2n = 42$ cromozomi), a fost translocată o genă de rezistență la rugina brună de la *Aegilops umbellulata* ($2n = 14$), una de rezistență la făinare de la secară, *Secale cereale* ($2n = 14$), de la *Agropyron intermedium* gene de rezistență la ruginile galbenă, brună și neagră etc. La tomate, *Lycopersicon esculentum* ($2n = 24$), au fost transferate gene de rezistență la viruși, la mană, la frig și secetă etc. de la *L. peruvianum*, *L. hirsutum*. Prin această metodă au fost transferate gene străine și la fasole, tutun, bumbac, orez, orz și alte specii autogame cultivate.

Metoda adiției cromozomilor străini se poate aplica la oricare specie, diploidă sau poliploidă, în timp ce substituirea cromozomilor este posibilă doar la speciile poliploide. Cu ambele metode s-au obținut realizări la speciile poliploide: grîu, tutun, bumbac, ovăz. Amfiploidizarea a fost aplicată cu succes la hibrizii grîu, *Triticum* × secară, *Secale*, care a dus la obținerea unui organism nou, creat în totalitate de om, numit *Triticale* ($2n = 8n = 56$). Această creație umană a generat multe speranțe începînd din 1930, anul obținerii primului amfiploid de acest tip.

Obținerea soiurilor hibride de primă generație sau F_1

Sămînța hibridă F_1 la speciile autogame. La plantele cu un sistem de reproducere autogamă, balanțele genice și funcționale interne sînt adaptate acestei modalități și, ca urmare, dezvoltă o vigoare ridicată în condițiile homozigoției depline. Cu toate acestea hibridarea între soiuri linii pure determină producerea unui surplus de vigoare la plantele hibride F_1. Vigoarea hibridă afectează mai ales caracteristici cum sînt capacitatea de reproducere și adaptarea la mediu și foarte puțin volumul organelor vegetative.

Prima sămînță heterozis a fost comercializată la tomate. La această specie prin castrarea manuală masculă (eliminarea

din floare a staminelor purtătoare de polen) a unei linii (A♀) și polenizarea artificială cu polenul recoltat de la o altă linie (B♂) se obține sămînța hibridă (A × B). Prin însămînțarea acesteia în producție se obțin plante F_1 ce manifestă vigoare hibridă și hemeostazie. Descoperirea unor alele mutante care suprimă formarea staminelor sau polenului, imprimînd plantelor sterilitate masculă genică, a eliminat necesitatea castrării manuale a florilor, dar a menținut polenizarea artificială. După același sistem se produce sămînța hibridă la vinete și salată, care au fructe sau inflorescențe ce produc numeroase semințe.

La sorg, *Sorghum vulgare*, prin descoperirea sterilității mascule citoplasmice ($Srf^{+}rf^{+}$) și a genelor Rf, care restaurează fertilitatea polenului în citoplasmă sterilizantă, s-au creat premisele producerii pe scară comercială a seminței hibride F_1. În acest scop, în cîmpul de hibridare, se însămînțează, în rînduri alterne, cele două linii, de exemplu, linia $A^{Srf+rf+}$ ♀ (citoplasmic mascul sterilă) × linia R^{RfRf} ♂ (restauratoare de fertilitate). Plantele hibride F_1 $(A \times R)^{SRfrf+}$ datorită alelei Rf sînt fertile. Succesul producerii seminței hibride la sorg este asigurat de predispoziția acestei specii la alogamie (polenizare încrucișată).

Pentru specii autogame cum sînt grîul, orzul, ovăzul, orezul și altele, strict autogame și la care dintr-o floare rezultă doar o sămînță, dar și la mazăre, fasole, in etc. se fac multe cercetări menite să asigure producerea în cantități mari a seminței hibride comerciale F_1. În această direcție, se va înregistra succes doar în cazul în care vor fi descoperite surse de citoplasmă sterilizantă masculă și gene restauratoare de fertilitate a polenului, foarte eficiente în inducerea castrării mascule biologice, fertilității și autofecundării normale a plantelor hibride F_1, neasociate (non-linked) cu gene cu efecte negative asupra dezvoltării producției de semințe și fructe etc.

Sămînța hibridă F_1 la speciile alogame. La plantele alogame, caracterizate prin polenizare liberă și fecundare încrucișată, populațiile sînt heterogene (polimorfe), iar indivizii heterozigoți. Fecundarea între gameții produși de plante diferite, la specii cum sînt: porumbul, secara, floarea-soarelui, ceapa, sfecla, varza, morcovul etc. face ca structura geno-

tipurilor să se schimbe în fiecare generație în care se manifestă doar alelele dominante, căci cele recesive rămîn ascunse.

Din cauza heterogenității, heterozigoției și schimbării structurii genotipurilor în generații succesive, pentru obținerea unor descendențe ameliorate, în populațiile naturale alogame s-a aplicat „metoda selecției în masă" — care constă în alegerea și folosirea la semănat, în fiecare generație a unui amestec de semințe rezultat din plantele cu fenotipul cel mai exprimat. Unele soiuri la plantele alogame, superioare populațiilor originale, au fost obținute prin aplicarea acestei metode. Deficiența metodei constă în faptul că alegerea se face după fenotip și nu după genotip, care nu se cunoaște, fiind variabil de la o generație la alta.

Consangvinizarea și heterozisul. Polimorfismul populațiilor cu fecundare încrucișată poate fi pus în evidență prin aplicarea consangvinizării (C), care constă în fecundarea controlată în procesul reproducerii sexuate a unor gameți strîns înrudiți. Pentru aceasta, la plantele hermafrodite (secară, sfeclă, ceapă etc.) și monoice (porumb, castravete, pepene etc.), cu ajutorul unor izolatori de pergament etc., florile sînt ferite de polen străin, ca urmare, polenizarea stigmatelor și fecundarea se face cu polen de pe aceeași plantă sau prin fecundarea între plante frate × soră la speciile dioice (sparanghel, spanac, căpșun etc.).

După 5—6 generații de consangvinizare succesivă (ca și în cazul autogamiei), heterozigoția este eliminată (cu 50% pe generație) astfel că descendenții devin homozigoți (proporția homozigoției după 5 consangvinizări este de 96,8%, iar după 6, de 98,43%) sau homogeni genetic și uniformi fenotipic. Descendența homozigotă obținută prin consangvinizare succesivă se numește *linie consangvinizată*.

Liniile consangvinizate, datorită homozigoției genotipului (stare contrară naturii speciilor alogame, care obișnuit se fecundează încrucișat), pierd vigoarea, adaptarea la condițiile mediului de viață și capacitatea de reproducere. Ele sînt produse artificiale și, ca urmare, se mențin și se înmulțesc doar controlat (prin consangvinizare).

Consangvinizarea, ca și autogamia, aduce locii (genele) în stare homozigotă, inclusiv, alelele recesive, producînd segregarea genotipurilor componente ale unui soi sau populație

cu polenizare liberă, ceea ce permite izolarea acestora sau a liniilor consangvinizate. Unele dintre acestea pot poseda toleranță față de polenizarea cu polen propriu și se pot caracteriza printr-o serie de însușiri ereditare valoroase: precocitate, talie mică, rezistență la boli și insecte, sinteza unor substanțe de către alele recesive ajunse în stare homozigotă. De exemplu, la porumb mutantele recesive *opaque*$_2$ — o_2 și *floury* — fl_2, în stare homozigotă, sintetizează lizină și triptofan, aminoacizi care îmbunătățesc mult calitatea proteinelor bobului; la sfecla de zahăr, mutanta recesivă *m* determină în stare homozigotă formarea exclusivă de glomerule monogerme, alela recesivă *ms* produce sterilitate masculă genică, alela mutantă dominantă R_f restaurează fertilitatea polenului în citoplasmă sterilizantă, alelele mutante care determină la pomii fructiferi o perioadă juvenilă foarte scurtă (care înfloresc la 2—3 ani de la altoire, însămînțare) și altele.

Cele mai importante trăsături ale liniilor consangvinizate sînt: păstrarea în stoc homozigot a diverselor genotipuri un șir nedeterminat de generații (prin fecundare controlată) și manifestarea de către unele linii a așa-numitei capacități combinative sau hibride ridicate (în cazul încrucișării controlate a două linii deosebite genetic). Expresia genetică a efectelor favorabile ale hibridării controlate ale unor linii homozigote a fost numită *vigoare hibridă* sau *heterozis*. Hibrizii între două linii (A × B — simpli) sau între patru linii (A × B) × (C × D) — dublii) manifestă superioritate față de liniile parentate în privința uneia sau mai multor caracteristici: vitalitate sporită, adaptabilitate ridicată, capacitate de reproducere superioară.

Vigoarea hibridă este maximă în prima generație hibridă — F_1 în care plantele sînt heterozigote 100% și uniforme. Hibrizii F_1 pot depăși cu 20—50% și mai mult producția soiurilor sau populațiilor cu plenizare liberă din care au fost extrase liniile consangvinizate. În generația a doua — F_2, rezultată din autopolenizarea sau interpolenizarea plantelor F_1 heterozigote, se formează 50% plante heterozigote și 50% homozigote, care nu numai că neuniformizează plantele, dar determină și o reducere la jumătate a vigorii hibride comparativ cu F_1. Reducerea în F_2 a heterozisului cu aproximativ 50% (reducere determinată de ajungerea în stare homo-

zigotă a 50% din plantele F_2), impune producerea continuă a seminței hibride, care se comercializează pentru a produce plantele din generația F_1, în cantitățile necesare pentru însămînțarea anuală a tuturor suprafețelor cultivate cu un anumit soi hibrid F_1.

La plantele adaptate la reproducerea vegetativă, prin clonarea plantelor F_1, vigoarea hibridă poate fi fixată în toate generațiile asexuate. Această modalitate va putea fi aplicată și la specii obișnuit sexuate (porumb, floarea-soarelui, sfeclă ș.a.), în urma perfecționării clonării unor țesuturi și realizarea embriogenizării și reconstituirii unor plantule *in vitro*. Din noile plantule s-ar putea obține răsad, care, prin plantare, va reproduce structura heterozigotului F_1 și ar manifesta vigoare hibridă[1]. O modalitate asemănătoare este cea aplicată la unii pomi fructiferi, cartof, garoafă, crizantemă, arbori forestieri etc. la care multiplicarea vegetativă prezervă heterozigoția (chiar și în cazurile cînd cei doi părinți au fost heterozigoți dar au manifestat o bună capacitate de combinare hibridă specifică.

Alături de înmulțirea vegetativă prin clonarea unor organe sau a plantelor F_1, fixarea și exploatarea heterozisului mai multe generații este posibilă și prin aplicarea unor metode genetice, cum este inducerea autopoliploidiei (dublarea numărului de cromozomi, de exemplu, la secară, de la $2x = 14$ cromozomi, la $4x = 28$ cromozomi, cînd genele vigorii nu mai segregă).

În general, liniile consangvinizate productive tind să dea și hibrizi F_1 productivi, de aceea selecția vizuală a liniilor pe baza taliei, vigorii, adaptabilității și producției, scurtează sensibil procesul de obținere a hibrizilor F_1.

Soiuri hibride F_1 au fost produse prima dată la porumb, în SUA. În producție au început să se răspîndească după 1929. În 1933, s-au însămînțat 143 000 acri (1 acru = 0,4 ha), care reprezenta 0,1% din totalul suprafeței cultivate; după 10 ani (în 1939), suprafața cultivată cu hibrizi F_1 reprezenta 22,5%, în 1949, 78,3%, în 1956, 90,8%, iar în 1968, 99%. Răspîndirea în producție a seminței hibride a determinat o creștere a producției aproximativ cu 25—50% (între 1945—

---

[1] Crăciun T., *Cultura de celule și țesuturi in vitro*, în *„Știință și tehnică"*, 5, București, 1979.

1956 la o scădere cu 25% a suprafeței totale cultivată cu porumb). În decada 1941—1950, producția de porumb a crescut cu 10 busheli (1 bushel = 35,24 l) față de decada 1924—1933 cînd se cultivau în principal soiuri cu polenizare liberă. Aproximativ între 1953—1956 producția de porumb din Statele Unite a crescut anual datorită seminței hibride cu peste 750 mil. busheli.

Porumbul hibrid s-a răspîndit rapid în Belgia — 99,0% în 1953, Olanda — de la 86% în 1953, la 92% în 1955, Franța — de la 28% în 1953, la 31,5% în 1955, Italia — 15,5% în 1953, la 23,4% în 1955, România — 0% în 1955 și aproximativ 90% în 1964 etc. Se estimează că datorită seminței hibride producția a crescut în Franța cu 115 000 tone în 1953 și 180 000 tone în 1954, care a reprezentat în plus un venit de aproape 12 mil., respectiv, 19 mil. dolari, iar în Italia producția a crescut cu 300 000 tone în 1953 și cu 550 000 tone în 1955, care valora aproape 22 mil., respectiv 42 mil. dolari. În ultimele două decenii marea majoritate a suprafețelor cultivate cu porumb, cu destinație comercială, practic, în toate țările, se însămînțează cu hibrizi interliniari F_1.

Producerea soiurilor hibride F_1 la porumb, ca de altfel și la unele curcubitacee (castravete, pepene, dovleac), a fost favorizată de faptul că pe plantele monoice inflorescențele sau florile femele și mascule se dezvoltă în poziții diferite și, ca urmare, castrarea masculă a liniei consangvinizate destinată a îndeplini rol de genitor matern (pe care se formează sămînța hibridă) se realizează cu ușurință.

Suprimarea staminelor sau castrarea masculă a unei flori hermafrodite prezintă însă mari dificultăți (la sfeclă, lucernă, floarea-soarelui etc)., și poate deveni practic imposibilă dacă floarea este mică și este inclusă într-o inflorescență (golomăț, timoftică, ceapă etc.). La asemenea specii, neexistînd posibilitatea castrării mascule manuale în masă, pentru transformarea unei linii în genitor funcțional femel, care să primească ușor și în cantități necesare polen de la linia genitoare masculă, nu s-a putut produce sămînța hibridă comercială F_1.

Descoperirea la ceapă, între 1937 și 1944, de către H.A. Jones și colaboratorii săi, a unui mecanism ereditar particular, nucleo-citoplasmic, care controlează atît sterilitatea masculă cît și restaurarea fertilității polenului a scos din

impas producerea seminței hibride comerciale F_1. Sterilitatea masculă genică — plasmagenică este determinată de două mutații, prima: schimbarea factorilor citoplasmici normali, *N* în *S* (factorii *N* permit funcționarea alelei normale rf^+ pentru producerea polenului, deci genotipul N rf^+rf^+— este mascul fertil, iar factorii *S* inhibă funcționarea alelei rf^+, deci genotipul *S* rf^+rf^+ este citoplasmic mascul steril), a doua: schimbarea alelei rf^+, în mutanta *Rf*, care se comportă dominant față de *S*, restaurînd fertilitatea polenului în citoplasmă S — sterilizantă, deci, genotipurile S^{RfRf} și S^{Rfrf+}, sînt mascul fertile restaurate.

După deplina înțelegere a sistemului de sterilitate masculă citoplasmică și a restaurării fertilității polenului în citoplasmă S, Jones și colaboratorii, au propus în 1943, o schemă pentru utilizarea acestui fenomen în scopul producerii comerciale a seminței hibride F_1 la ceapă. Potrivit acestei scheme linia mascul sterilă AS^{rf+rf+} se înmulțește prin încrucișare controlată (fără castrare) cu linia normală analogă AN^{rf+rf+} (care este fertilă), apoi, linia AS^{rf+rf+} se însămînțează altern alături de orice linie mascul fertilă (B, R,. etc.,) deosebită genetic, cu capacitate de combinare ridicată. (Deoarece la ceapă, prin cultivarea generației F_1, se urmărește obținerea unui organ vegetativ, bulbul, și nu a seminței, polenizatorul, nu este necesar să aibă alele *R*f. Spre deosebire, cînd în F_1 se urmărește obținerea de semințe, genitorul patern trebuie să aibă alele *R*f). La ceapă, hibrizii interliniari astfel produși au depășit soiurile comerciale originale cu polenizare liberă cu un spor de producție mai mare de 50%.

După ceapă, sterilitate masculă genică-plasmagenică a fost descoperită la sfecla de zahăr (1942), morcov (1947), porumb (1950), floarea-soarelui (1969) și alte specii de plante alogame (dar și la autogame: sorg, în 1954, grîu, în 1961, bob, în 1963 ardei, în 1973 etc.).

La porumb, sterilitatea masculă citoplasmică de tip Texas sau T și genele restaurării fertilității polenului (Rf_1 și Rf_2) au fost descoperite în soiul Mexican June (originar din Texas). Eliminarea castrării mascule și restaurarea fertilității polenului la plantele hibride F_1 nu numai că a redus prețul de cost al seminței hibride, dar a ridicat sensibil și uniformitatea și valoarea seminței, care putea ajunge ușor la 100% heterozigiție în F_1.

Obținerea liniilor consangvinizate și transferul prin backcross a citoplasmei sterilizante și a genelor restauratoare de la donori specifici în orice linie cu capacitate combinativă ridicată a făcut ca metoda obținerii soiurilor hibride F_1 să fie aplicată rapid și cu succes la principalele specii alogame cultivate. În funcție de ordinea aplicării acestei tehnici, în 1962, în S.U.A., sămînța hibridă ocupa din totalul suprafeței cultivate 23% la ceapă, 60% la sfecla de zahăr, 85% la porumb, 90% la sorg.

Alături de reușita cu adevărat spectaculară a hibrizilor F_1 la speciile menționate, ulterior soiuri hibride F_1 au fost produse și s-au extins și la floarea-soarelui, varză, morcov, unele specii furajere (produse pe baza sterilității mascule), precum și la castravete și pepene (care exploatau fenomenul de ginoecie: inducerea chimică a unor flori funcțional femele), la spanac și sparanghel (dioice), ca și la unele specii floricole (hibrizii F_1 de calceolarii, geranium, ciclamen, petunii, begonii, primula la care predomină hibridarea manuală).

Liniile consangvinizate pot fi ameliorate în privința unor caracteristici ereditare prin includerea în genotipul lor, mai ales prin backcross, a unor alele de la diverse linii donor. După transfer, descendenții ameliorați se consangvinizează pentru homozigotare. Linii noi, ameliorate, pot fi extrase și din cele mai bune soiuri hibride F_1, sau din combinațiile hibride rezultate din interpolenizarea liberă a cîtorva dintre cele mai bune linii. Aceste linii, din ciclul II, III etc. de consangvinizare, datorită îmbunătățirii genotipurilor în urma combinărilor libere a genelor sau recombinărilor genelor linkage ca și a transferului de diverse gene, pot produce hibrizi F_1 cu performanțe din ce în ce mai bune comparativ cu performanțele realizate de hibrizii F_1 obținuți din liniile din primul ciclu de consangvinizare.

Sporirea continuă a capacității de producție și îmbunătățirea calității acesteia sînt motive foarte serioase care determină extinderea la tot mai multe specii și pe suprafețe tot mai mari a soiurilor hibride F_1. Indirect, aceste realizări încurajează și eforturile de cercetare care urmăresc perfecționarea continuă a metodelor de lucru și a caracteristicilor noilor genotipuri.

Crearea soiurilor la plantele adaptate la reproducerea vegetativă

Specii cum sînt cartoful, vița de vie, mărul, părul, majoritatea plantelor ornamentale, portocalul, trestia de zahăr, bananul, plopul etc. se înmulțesc vegetativ. Acest tip de reproducere are la bază diviziunea celulară mitotică.

Reproducerea vegetativă prezervă neschimbată structura genotipurilor. Ca urmare, fragmentarea sau clonarea corpului unei singure plante inițiale, dă naștere unei descendențe formată din indivizi uniformi genetic. O asemenea descendență omogenă genetic formează o *clonă*. Înseamnă că la speciile cu reproducere vegetativă, soiurile constau dintr-o clonă sau o populație de clone asemănătoare fenotipic.

Soiurile clonale se pot heterogeniza în urma unor mutații genice somatice (apărute în locii din celule corporale) sau alte schimbări genetice (dislocație și ploidie) care se manifestă prin includerea în muguri (variații mugurale). Cînd asemenea variații mugurale, apărute spontan sau induse cu ajutorul unor agenți fizici și chimici, afectează caracteristici fenotipice detectabile, ele pot fi supuse selecției. Astfel, prin aplicarea selecției intraclonale se pot pune bazele unor noi clone, respectiv, unor noi soiuri.

Mutațiile somatice pot afecta orice parte a plantei: capacitatea de producție, culoarea, mărimea și forma florilor, fructelor și frunzelor, tipul creșterii, maturitatea, adaptabilitatea etc. La pomii fructiferi multe soiuri s-au obținut prin descoperirea, detașarea și înmulțirea unor mutații genice care afectau caracteristici ale tulpinii (mutantele „spur" au habitus compact și scurt, o lungime redusă a internodului, precocitate și produc fructe multe încă în anul al doilea după altoire. Așa sînt soiurile Yellospur, Starkspur, Morspur, Wellspur etc., la care numărul pomilor la un hectar poate ajunge la 50 000—110 000, de 11—25 de ori mai multe plante la hectar comparativ cu soiurile din care au apărut: Golden Delicious și Red Delicious (între 2 000 și 10 000 pomi/hectar). Variațiile mugurale determinate de multiplicarea genomilor în celule somatice stau la baza dezvoltării unor soiuri tetraploide de viță de vie (Muscat gigas, Sultanina gigas, $2n = 4x = 76$ cromozomi) etc.

Utilizarea unor tehnici și medii adecvate cerințelor culturii *in vitro* a celulelor sau ale unor țesuturi meristematice va putea asigura generalizarea reproducerii vegetative la toate plantele cultivate, inclusiv a acelora care, obișnuit, se reproduc sexuat (porumb, floarea-soarelui, sfeclă etc.). Această metodă este potrivită atît pentru practica producerii materialului săditor, cît și pentru cercetările de genetică, pentru inducerea variabilității genetice prin plasarea în mediul de cultură a unor agenți mutageni și activitatea de selecție a noi genotipuri cu caracteristici ameliorate.

Utilizarea poliploidiei în dezvoltarea soiurilor

Poliploidia, sau fenomenul acumulării spontane de genomi în același nucleu a avut un rol însemnat în evoluția speciilor vegetale în direcția adaptării la condiții climatice excesive. Astfel, în Sahara de nord proporția speciilor poliploide este de 37,8% (din 300 specii în floră), în România ajunge la 46,8% (din 3 365 specii), în Danemarca la 53,5% (din 1 306 specii), în Norvegia la 57,6% (din 956 specii), iar în Insulele Spitzbergen la 76,2% (din 145 specii). Majoritatea speciilor, mai ales perene din familiile Gramineae, Rosaceae, Polygonaceae și altele, precum și unele specii din genurile *Solanum*, *Beta*, *Prunus*, *Trifolium* etc. sînt poliploide.

Creșterea numărului garniturilor cromozomice a survenit fie prin multiplicarea cromozomilor proprii (autopoliploidie), fie în urma hibridărilor interspecifice sau intergenerice urmate de dublarea cromozomilor din celulele zigotice sau somatice ale hibrizilor (alopoliploidie).

Autopoliploidia naturală a dus la generarea unui număr însemnat de specii, care s-au adaptat înmulțirii asexuate, prin fragmente de organe vegetative (tulpini, ramuri, frunze), bulbi, tuberculi, rizomi ș.a. Sînt specii autotriploide naturale: bananierul de masă ($3x = 33$ cromozomi), unele specii de cartof ($3x = 36$), de lalea ($3x = 36$) etc., iar autotetraploide sînt lucerna ($4x = 32$), usturoiul ($4x = 32$) ș.a.

Alopoliploidia, la rîndul ei, a asigurat formarea unora dintre cele mai importante specii cultivate. De exemplu, specia strămoșească diploidă de grîu, *Triticum monococcum* ($2x = 14$ cromozomi, cu genomii AA), după hibridarea spon-

tană cu specia diploidă *Aegilops speltoides* ($2x = 14$, cu genomii BB), a dat naștere treptat unei specii alotetraploide, *T. dicoccoides* ($4x = 28$ cromozomi, cu genomii AABB), care, la rîndul ei, după hibridarea cu *Ae. squarrosa* ($2x = 14$, cu genomii DD) a pus bazele speciei alohexaploide de grîu comun, *T. aestivum* ($6x = 42$ cromozomi, cu genomii AABB-DD) care asigură practic, lumii întregi pîinea cea de toate zilele. Tot alopoliploizi naturali sînt și bumbacul ($4x = 52$), ovăzul ($6x = 42$), tutunul ($4x = 48$), prunul ($6x = 48$), dalia ($8x = 64$). Autoalopoliploidia a contribuit la formarea topinamburului ($6x = 102$), fleum ($6x = 42$) etc.

La plantele poliploide, pe lîngă o adaptabilitate sporită, diverse țesuturi și organe sînt sensibil mai mari comparativ cu speciile sau genotipurile diploide. Fructele, florile, frunzele, tulpinile, rădăcinile, datorită faptului că nucleii și, ca urmare, și celulele, au un volum uneori dublat sau triplat, pot avea dimensiuni mult sporite. Acesta a fost principalul motiv pentru care genotipurile poliploide apărute spontan în diverse specii cultivate au fost remarcate și utilizate. Cele mai răspîndite soiuri de zambilă, trandafir, lalea, iris, narcisă, azalee, cireș japonez etc., cu flori gingașe, mari parfumate, deosebit de atractive, sînt poliploide. De asemenea, soiurile de măr, păr, viță de vie, zmeur, cu fructe sau boabe uriașe, au în nucleul celular 3, 4 sau mai mulți genomi.

Relevarea citologică, în primele două-trei decenii ale secolului nostru că unele din cele mai răspîndite și valoroase soiuri cultivate sînt poliploide a fost unul dintre stimulii majori ai cercetărilor de genetică aplicată (alături de studiul evoluției populațiilor cultivate și prelucrarea descendențelor hibride intraspecifice, de consangvinizare și producerea hibrizilor F_1, de inducere și detectare a mutațiilor, de hibridare îndepărtată).

Inducerea în laborator a dublării numărului de cromozomi prezenta un interes deosebit pentru cel puțin două trăsături: marea homeostazie și productivitate și marea stabilitate a genotipurilor (poliploidia fixează, ca atare, genomii implicați, iar reproducerea vegetativă inhibă orice fel de segregare).

Metoda producerii artificiale a poliploizilor a căpătat o eficiență remarcabilă abia după descoperirea de către A.F. Blakeslee și A.G. Avery, în 1937, a faptului că celulele meris-

tematice, în prezența colchicinei (alcaloid extras din planta *Colchicum autumnale*), realizează o diviziune normală a cromozomilor, dar nu mai formează fus de diviziune. Ca urmare, în celulele tratate cu anumite soluții slabe de colchicină (între 0,001 și 1%), un timp limitat (pînă la 18—22 ore, cît durează o diviziune celulară mitotică), genomii se dublează: de la $2x \rightarrow 4x$ cromozomi (sau $8x$, $16x$ etc.). Numărul dublat sau multiplicat de genomi la poliploizii artificiali, cu deosebire la autopoliploizi face ca diviziunea meiotică (de formare a gameților) să nu se desfășoare normal. Aceasta determină o reducere sensibilă a fertilității (a numărului de semințe). Astfel, autotriploizii sînt sterili, iar la autotetraploizi meioza este variabilă, de la o desfășurare normală și pînă la una anormală. Din această cauză au un succes deplin genotipurile poliploide la speciile cultivate pentru masa vegetativă sau un organ vegetativ și mai puțin la speciile cultivate pentru producția de sămînță. (Începînd din 1949 s-au răspîndit în producție, în Suedia, R.D.Germania, R.F. Germania, Polonia, soiuri autotetraploide de secară, $4x = 28$ cromozomi, ale căror boabe sînt cu 40—60% mai grele și de calitate mai bună comparativ cu formele originare, diploide, $2x = 14$. Producția soiurilor $4x$ de secară este însă mai mare decît aceea a soiurilor $2x$, doar cu 10—15%, deoarece numărul de boabe din spic este cu 20—25% mai mic decît cel produs de soiurile diploide).

În cultură sînt larg răspîndite soiuri poliploide induse la sfeclă (de zahăr, furajeră și roșie), lolium și galomăț, la păr, măr, viță de vie, zmeur, la pepene verde, ridiche și varză, la crin, gura leului, garoafă și multe alte specii.

Despre *Triticale*, obținut din însumarea cromozomilor grîului și ai secarei ($6x = 42 + 2x = 14 = 56$ cromozomi) se poate afirma că nu este un simplu soi, ci o adevărată nouă specie. Așa cum a fost precizat, cercetări avînd acest obiectiv au fost desfășurate începînd din 1930. De la primele plante obținute a fost remarcată marea rezistență la cădere și la boli. Recent, s-a stabilit că aceste plante au o sporită toleranță la erbicide și la asfixiere în soluri umede, o absorbție ridicată și mai eficientă a îngrășămintelor cu azot. Potențialul mediu de producție al triticalelor este de 45—46 q/ha, iar în condiții favorabile de 70—80 q/ha. Boabele au un conținut de proteine egal cu al grîului, dar proteinele sînt mai

sărace în aminoacizi esențiali, cum este lizina, pe care organismul uman nu o sintetizează. Din această cauză triticalele sînt mai potrivite pentru furajarea animalelor iar în amestec cu 70% grîu și pentru prepararea pîinii. O altă realizare importantă recentă este soiul de grîu Roazon creat în Franța, prin hibridare între grîu și *Aegilops* și backcross. Acest soi are o mare rezistență la ciuperci parazite și temperaturi excesive, suportă monocultura și realizează producții medii de 50 q/ha.

Combinarea efectelor pozitive ale autopoliploidiei, mutației genice, consangvinizării, heterozisului și sterilității mascule. Aplicarea în ameliorarea sfeclei a cuceririlor științifice privind mecanismele eredității constituie un model demn de urmat. Sfecla cultivată este un produs al activității de ameliorare desfășurară de om din 1801, cînd a fost construită prima fabrică de zahăr din sfeclă. Atunci, rădăcinile selecționate aveau un conținut maxim de zahăr de 7—8% (selecția aplicată metodic de Achard, începînd în 1786, în populația de sfeclă albă de Silezia a triplat conținutul de zahăr, care, inițial, era de 2,5%).

Diversele tipuri de sfeclă aparțin speciei *Beta vulgaris*, cu $2n = 2x = 18$ cromozomi. Are flori hermafrodite, grupate în buchete de cîte 3—5 (pînă la 10), concrescute într-un glomerul, cu polenizare încrucișată, din cauza autoincompatibilității polenului propriu. Mutația locilor care controlează aceste caracteristici poate produce mutante cu flori lipsite de stamine (mascul steril de la *Ms* la *ms*), monogerme (cu o singură floare și sămînță în glomerul de la *M* la *m*), care să accepte polenul propriu (autocompatibile, de la *S* la *Sf*).

Pînă în deceniul 50, în ameliorarea sfeclei de zahăr se aplica o metodă care combina selecția individuală (tipică autogamelor) cu selecția pe familii (tipică alogamelor). Așa s-au obținut soiuri cu rădăcini mai mari (de 500—600 g), mai bogate în zahăr (pînă la 18%), rezistente la boli. O adevărată revoluție pentru ameliorarea sfeclei de zahăr a început în 1940, în urma descoperirii de către cercetătorii canadieni Peto și Boyes, cum că nivelul optim de poliploidie la formele cultivate nu este nici diploidia ($2x = 18$ cromozomi) și nici autotetraploidia ($4x = 36$ cromozomi), ci triploidia

($3x = 27$ cromozomi). Cu ajutorul colchicinei au fost obținute forme $4x$, care aveau frunze, rădăcini și semințe mai mari, dar erau mai tardive și produceau un procent mai mic de zahăr comparativ cu formele originare $2x$. Cercetările au relevat însă că formele tetraploide sînt genitori excepționali, dacă se încrucișează controlat cu anumite soiuri diploide, pentru obținerea semințelor triploide: $4x = 36 \times 2x = 18 = 3x = 27$ cromozomi. Datorită autoincompatibilității, genitorul $4x$ se fecundează cu polen de la genitorul $2x$, producînd o proporție de 80—90% semințe triploide. Plantele triploide îmbină avantajele poliploidiei cu cele determinate de vigoarea hibridă F_1. Astfel, triploizii se caracterizează prin producție mare de rădăcini și conținut ridicat de zahăr: cu 10—15% mai multe rădăcini și 10—18% mai mult zahăr la hectar, comparativ cu soiurile diploide. Primele soiuri triploide de sfeclă de zahăr au fost folosite în producție în 1950 în R.F. Germania și, în 1952, în Japonia. Însemnatele avantaje ale acestora au făcut ca ele să se răspîndească exploziv în Europa. Astfel, în 1959, soiurile triploide ocupau din suprafața cultivată cu sfeclă de zahăr: 80% în Austria, 60% în Danemarca, 98% în Italia, 70% în Ungaria (în 1962), o însemnată suprafață în România etc.

Spre deosebire de Europa, în S.U.A., ameliorarea capacității de producție a sfeclei de zahăr s-a realizat ca și la porumb, prin aplicarea consangvinizării și obținerea seminței hibride simplă și dublă F_1 (la nivel diploid). Cu toată depresiunea mare a liniilor consangvinizate, în urma unor eforturi, s-au obținut hibrizi F_1, care asigurau sporuri de producție de rădăcini și zahăr cuprinse între 15—25% și chiar mai mari față de soiurile genitoare cu polenizare liberă. Aceste sporuri de producție erau asigurate la 100% sămînță hibridă F_1. Pentru aceasta au fost căutate surse de sterilitate masculă citoplasmică. O asemenea sursă a fost descoperită de F.V. Owen, în S.U.A., în 1942. Acesta a folosit-o în producerea seminței hibride interliniare F1, în 1945, după o schemă similară aceleia de la ceapă. După această dată sterilitatea masculă citoplasmică a fost transferată, prin backcross, în numeroase linii consangvinizate de sfeclă de zahăr, în vederea încrucișării controlate pentru producerea semințelor hibride comerciale F_1.

Mecanizarea culturii sfeclei de zahăr şi distribuţia echidistantă a plantelor pe teren era puternic frînată de răsărirea din acelaşi glomerul a unui buchet de 2—10 plantule. Acest impediment serios solicita intervenţia manuală. Oricît au fost perfecţionate tehnicile de rărire a plantulelor şi de spargere a glomerulelor poligerme şi aducerea lor mecanică la monogermie efectele negative ale poligermiei nu au putut fi eliminate cu totul. Iată însă că, în 1950, cercetătorul american V.F. Savitsky, a găsit în soiul Michigan Hybrid 18, o plantă homozigotă autocompatibilă (*SfSf*), care producea constant glomerule monogerme (*mm*). Din această plantă a fost creată forma monogermă SLC 101. Aceasta constituie donorul, practic, universal de monogermie, în toate programele de ameliorare a sfeclei de zahăr.

În anii '60 şi '70, în principalele ţări cultivatoare în producerea seminţei de sfeclă de zahăr, furajeră şi de grădină, au început să fie folosite toate aceste descoperiri. Astfel, s-a extins consangvinizarea prin folosirea genotipurilor autocompatibile, iar în liniile care urmau să îndeplinească rol de genitor matern era transferată alela pentru monogermie, citoplasma care produce sterilitate masculă şi se inducea autotetraploidia. Asemenea linii homozigote, autotetraploide, citoplasmic mascul sterile şi monogerme se încrucişează cu linii diploide plurigerme sau monogerme pentru a produce sămînţă 100% triploidă, heterozis, monogermă, din care în producţie rezultă plantele F_1 foarte productive şi de bună calitate.

Pe piaţa internaţională a fructelor o cifră de afaceri printre cele mai mari în ultimele două decenii o realizează pepenele verde. „Boom"-ul (succesul) economic a fost determinat de lansarea în cultură, în Japonia, de către Kihara, în 1951, a seminţei triploide. Acest mare genetist, prin aplicarea colchicinei asupra pepenelui verde, *Citrullus vulgaris* diploid, $2x = 22$ cromozomi, a obţinut pepeni verzi autotetraploizi, $4x = 44$. Din încrucişarea, $4x = 44♀ \times 2x = 22♂$ s-a obţinut pepenele verde triploid, $3x = 33$. (Pentru obţinerea unei seminţe hibride 100% forma mamă care produce atît flori femele cît şi mascule este castrată mascul prin înlăturarea florilor cu stamine care produc polen. Pe forma mamă se pot dezvolta numai flori funcţional femele

prin unisexualizare genetică sau prin tratare cu unele substanţe de creştere, de exemplu, cu auxine: acid α — naftalen-acetic şi acid β — indolacetic, în concentraţie de 0,1%). În acest caz, alături de folosirea efectelor triploidiei şi heterozisului, care determină un însemnat spor de producţie şi o îmbunătăţire a calităţilor gustative (fructul este mai dulce), sînt folosite şi anomaliile meiotice. Astfel, pe planta triploidă cresc fructe în a căror pulpă nu se formează seminţe (ca şi la banana comestibilă).

Modelate de ingeniozitatea naturii sau a omului, speciile de graminee perene, grîul comun şi bumbacul, bananul, trestia de zahăr şi plopul negru hibrid, unele soiuri de măr şi păr, de sfeclă şi pepene verde, de flori etc. cu o capacitate homeostatică ridicată, cu producţie mare şi calitate superioară, sînt cîteva exemple care relevă forţa uriaşă a poliploidiei în evoluţia spontană sau cultivată a unor plante.

VULNERABILITATEA GENETICĂ

Uniformitatea genetică — avantaje...

O trăsătură definitorie a metodelor de cercetare a fenomenelor ereditare constă în utilizarea unor organisme uniforme genetic, cum sînt liniile pure, liniile consangvinizate şi clonele. Din cele menţionate anterior reiese că şi ameliorarea modernă ca şi producerea seminţei comerciale F_1 şi a materialului săditor, utilizează tot genitori uniformi genetic. Această trăsătură, adică uniformitatea genetică, care determină uniformitate fenotipică, trebuie să caracterizeze şi soiurile linii pure şi soiurile de primă generaţie hibridă, F_1, ca şi soiurile clonale noi, deoarece agricultura contemporană, dar şi societatea actuală, pretind uniformitate pentru formele cultivate. Aşa cum s-a menţionat deja, uniformitatea soiurilor în privinţa fenofazelor, a mărimii seminţelor sau fructelor, a calităţii etc. este cerută de mecanizarea completă a lucrărilor de întreţinere şi recoltare, de industria alimentară şi de comerţ, precum şi de consumatori.

În societatea actuală are loc nu numai circulaţia rapidă a cunoştinţelor, a noilor cuceriri în domenii diverse ale ştiinţei, ci şi a realizărilor, de exemplu, a unor noi surse de plasmă germinativă, a unor genotipuri noi, a unor alele mutante utile etc. Circulaţia surselor noi de plasmă germinativă, în special a unor gene originale sau a unor mutante genice sau plasmagenice recent apărute sau de curînd descoperite, prezintă mari avantaje, dar şi mari riscuri.

Circulaţia noilor surse genetice, care controlează caracteristici ereditare valoroase, permite ca acestea să fie încorporate în soiurile răspîndite în principalele ţări cultivatoare.

De altfel, una dintre preocupările majore ale geneticienilor constă în transferul, prin metode genetice de includere a genelor, cromozomilor, citoplasmelor cu caracteristici ereditare valoroase, în genotipul cît mai multor, sau al majorităţii formelor dintr-o anumită specie cultivată la un moment dat într-o zonă, într-o ţară sau chiar în continente întregi. În activitatea de creare a unor genotipuri superioare, metoda transferului, de la o sursă sau donor la o formă receptor supusă îmbunătăţirii, a unor particule ereditare purtătoare de caracteristici valoroase, are o largă întrebuinţare, fiind aplicată în activitatea de ameliorare la marea majoritate a speciilor vegetale cultivate.

De exemplu, citoplasma de tip Texas (T), cu proprietatea de a steriliza polenul la porumb, descoperită de Rogers şi Edwardson, în 1952, în soiul Mexican June, în statul Texas, S.U.A., a fost transferată, în deceniile '60 şi '70, practic, în toate liniile consangvinizate utilizate în procesul de producere (fără castrare manuală) a seminţei hibride comerciale de porumb. Astfel, citoplasma T era transferată atît în liniile materne A, dar şi C în cazul unor hibrizi dubli (AB) × (CD), în vederea transformării acestora în genitori funcţionali femeli (citoplasmic masculi sterili, S^{rf+rf+}), cît şi în liniile paterne (R în cazul hibrizilor simpli A × R sau D în cazul unor hibrizi dubli), în vederea funcţionării ca un tester în procesul transferării alelelor Rf, dar şi în procesul înmulţirii liniilor restauratoare şi producerii seminţei hibride F_1 restauratoare. Transferul citoplasmei T a eliminat operaţia castrării sau înlăturării manuale a paniculelor liniei materne (A) în producerea seminţei hibride 100%, iar încor-

porarea alelei mutante Rf în linia tată (R) face ca hibridul simplu F_1 (AR^{SRfrf+}) să producă polenul necesar fecundării şi dezvoltării boabelor.

Tot astfel, genele mutante recesive o_2 şi fl_2, care au proprietatea de a sintetiza proteine endospermice cu un conţinut scăzut în zeină, dar bogate în aminoacizii lizină şi triptofan, sînt transferate, în prezent, în tot mai multe linii consangvinizate de porumb implicate în producerea seminţei hibride F_1. Aceste gene mutante au fost descoperite, de Jones şi Singleton, în 1934, într-un porumb din statul Connecticut (S.U.A.). Rolul genelor recesive opaque şi floury a fost stabilit abia după 30 de ani, de E.T. Mertz (1963) şi D.E. Nelson (1965). Cercetări ample, efectuate de colective de geneticieni, biochimişti, nutriţionişti umani şi animali, au stabilit că prin încorporarea genelor o_2 şi fl_2 (în stare homozigotă), în diverse linii şi hibrizi, se obţin forme ameliorate calitativ, a căror proteină endospermică conţine cu 68—131% mai multă lizină şi cu 60—133% mai mult triptofan decît porumbul obişnuit (care conţine genele normale dominante O_2 şi Fl_2). De exemplu, linia W 64A normală (cu O_2 şi Fl_2), în proteina endospermică conţine (în g la 100 g proteină) 1,6 g lizină şi 0,3 g triptofan, în timp ce aceeaşi linie cu o_2o_2 conţine 3,7 g lizină şi 0,7 g triptofan, iar cu fl_2fl_2 conţine 3,3 g lizină şi 0,8 g triptofan/100 g proteină endospermică. Conţinutul în lizină la unii hibrizi bogaţi în acest aminoacid poate ajunge între 4,2—5,8% din proteina totală. Sporirea în porumbul cu o_2 a conţinutului de lizină de 2,3 la 3,6 ori, iar al triptofanului de peste 2 ori, comparativ cu porumbul normal, imprimă o valoare alimentară deosebită, care asigură sporuri de creştere la animale (porcine mai ales) de 2—3 ori mai mari faţă de porumbul obişnuit. În programele de ameliorare a porumbului din multe ţări se utilizează ca donor, pentru aceste mutante, fie stocuri homozigote importate din S.U.A., fie genotipuri mutante cu endosperm opac detectate în populaţii europene supuse consangvinizării. Unii hibrizi interliniari de porumb creaţi în România, cum sînt HS 330, precum şi unii obţinuţi începînd cu anul 1970: HS 335 — opac — Fundulea; Lizin 250 — Turda şi alţii, omologaţi în producţie, sînt bogaţi în lizină.

Un alt exemplu larg cunoscut de transfer genic îl reprezintă alela mutantă recesivă *m*, la sfecla de zahăr. Aşa cum s-a precizat, alela *m*, în stare homozigotă (*mm*) determină formarea de glomerule monogerme, caracteristică ce înlătură necesitatea răririi plantulelor, permiţînd însămînţare mecanică „bob cu bob", fapt care asigură mecanizarea integrală a lucrărilor de întreţinere a culturilor de sfeclă de zahăr. Aceste avantaje au făcut şi fac ca alela *m* să fie încorporată prin backcross în toate liniile consangvinizate de sfeclă utilizate ca genitori materni în producerea seminţei heterozis, în materialul iniţial care urmează să fie poliploidizat, precum şi în majoritatea soiurilor diploide cultivate.

La speciile cultivate pentru seminţe şi fructe, mărimea producţiei depinde de competiţia pentru asimilate dintre primordiile florale şi alte puncte de creştere activă. Or, cel mai mare competitor în faza formării şi creşterii primordiilor florale este creşterea tulpinii, care consumă cantităţi mari de asimilate într-o perioadă scurtă (în dauna fructificării). După sesizarea acestei competiţii, utilizarea genelor pentru talie scurtă, în vederea creşterii proporţiei asimilatelor destinate creşterii primordiilor florale a devenit un obiectiv însemnat în procesul de ameliorare a plantelor şi de îmbunătăţire a tehnologiilor de cultură. Crearea unor soiuri cu tulpina scurtă sau cu creştere limitată a revoluţionat sistemul de cultură şi însăşi producţia la unele specii cerealiere, la pomi etc. În această privinţă sînt bine cunoscute cîteva cazuri. De exemplu, la sorg, genele mutante recesive dw_1, dw_2, dw_3 şi dw_4 (descoperite de Quinby şi Karper, 1954) cînd sînt în stare homozigotă reduc talia plantei de la 150—200 cm la 50—60 cm. O dată cu reducerea înălţimii care permite mecanizarea completă a culturii şi utilizarea setului de maşini de la grîu, are loc o sporire însemnată a numărului de panicule la unitatea de suprafaţă şi o creştere a numărului şi mărimii boabelor în panicul. Aceste gene au fost transferate, practic, în majoritatea formelor de sorg cultivate în ţări cu agricultură intensivă. La grîu, genele rht_1 şi rht_2 descoperite în soiul japonez Norin 10, reduc talia plantei cu 35—50%, comparativ cu soiurile normale, şi sporesc numărul de spice la unitatea de suprafaţă şi de boabe în spic. Aceste gene au fost transferate în unele soiuri cultivate

în California, precum şi în soiul Gaines, semipitic, creat în S.U.A.. deţinătorul recordului mondial al producţiei: 14 210 kg/ha. Genele *rht* au fost transferate şi în alte soiuri, inclusiv în soiurile hiperproductive create, în Mexic, de N.E. Borlaug, care au stat la baza acelui vast program de dezvoltare agricolă, denumit „Revoluţia verde". Gene pentru talie scurtă au fost descoperite şi la orez şi orz etc., care determină o creştere substanţială a producţiei.

La măr, mai ales, dar şi la păr, alela normală *N* produce port înalt, iar alela mutantă recesivă *n* produce port compact, denumit „spur". Mutanta „spur" se caracterizează prin habitus compact şi scurt, o lungime redusă a internodului, o limitare a ramificării, deosebită prolificitate şi precocitate, producînd fructe multe şi în mod regulat încă din primii ani. De aceea programele de ameliorare a pomilor vizează fie transferul acestor gene mutante, fie inducerea unor mutaţii genice similare şi la alte specii, deoarece acestea asigură creşterea sensibilă a densităţii pomilor şi a producţiei de fructe.

La fel se prezintă situaţia cu multe gene pentru alte caracteristici, cu deosebire a unor gene care imprimă rezistenţă la diverse boli sau dăunători, originare din specii sau genuri sălbatice, care prin aplicarea hibridării, eventual a iradierii pentru inducerea translocaţiilor, urmate de backcross şi testare în condiţii de atac, au fost sau sînt transferate de la diverşi donori în diferite genotipuri ale speciilor cultivate.

Transferul genetic controlat are marele avantaj că soiurile din cultură, adaptate condiţiilor pedoclimatice dintr-o zonă şi faţă de care cultivatorii manifestă preferinţă, îşi păstrează majoritatea trăsăturilor care le caracterizează. În plus, în genotipul lor este încorporată o genă sau plasmagenă care le conferă, fie o comportare mai pretabilă faţă de intensivizarea culturii (mecanizare, irigare), fie o însuşire fiziologică de adaptabilitate mai mare la mediu (rezistenţă la temperaturile extreme excesive, la bolile şi dăunătorii din zona de cultură) sau o calitate superioară (tehnologică, a substanţelor etc.).

În concluzie, acţiunea de transfer genetic practicată în majoritatea ţărilor, din puţine şi aceleaşi surse de plasmă

germinativă, alături de uniformitatea fenotipică pretinsă de tehnologiile de cultură, valorificare și consum, realizează o uniformitate genotipică, o uniformitate genetică (homozigotă la linii, heterozigotă la toți locii la hibrizii F_1). În prezent, multe dintre principalele soiuri și linii genitoare pentru hibrizii F_1, la cele mai importante specii agricole, ori au fost create prin folosirea sau implicarea aceluiași material inițial de ameliorare, ori au fost îmbunătățite prin transferul genetic al acelorași determinanți ereditari.

...riscuri

Se știe: agricultura nu este niciodată eliberată de hazard. Oricînd, un factor abiotic sau biotic, din mediu, poate interveni brutal, prin intensitate sau număr, și să dezechilibreze viața normală a plantelor dintr-un soi sau hibrid F_1, din soiuri sau hibrizi F_1 înrudiți, a genotipurilor dintr-o specie sau specii înrudite, cultivate într-o zonă limitată sau extinsă. Unele dintre aceste efecte negative rezidă în uniformitatea genetică. Ca și monocultura, uniformitatea genetică, alături de multe trăsături pozitive, determină și multe riscuri dintre care profund negativ este faptul că uniformitatea genetică „invită“ epidemiile, determinînd vulnerabilitatea genetică a culturilor la boli și dăunători (dar și la ger și secetă). Acest fenomen, al vulnerabilității genetice, apare fie datorită faptului că genele de rezistență s-au pierdut în procesul de ameliorare, fie că patogenii s-au schimbat prin mutație, rezultînd rase noi care, găsind condiții foarte favorabile de mediu, realizează atacul în masă al culturilor.

Această afirmație poate fi susținută prin exemple mai vechi sau mai recente care constituie, în unele cazuri, adevărate cataclisme pentru mari grupuri umane. Să ne amintim recentul serial de la televiziune „Dragoste și ură“, ecranizare a romanului scriitoarei Agnes Nixon. Acțiunea se derulează pe fundalul marii foamete din Irlanda, din iernile 1845 și 1846, extrem de severe, agravate de ignoranța și lipsa de umanism a proprietarilor agrari, dar și de legile engleze asupra cerealelor, deosebit de restrictive, care interziceau distribuirea alimentelor la sate. Foametea a fost o consecință a distrugerii, începînd din 1840, de către mană, produsă de ciuperca *Phytophthora infestans* (de la cuvintele grecești *phyton* — plantă și *phthora* — distrugere), a cartofului, practic, singura cultură din insulă. Această boală a distrus atît plantele cît și oamenii, determinînd exodul unei însemnate părți a populației irlandeze spre pămîntul american.

Genotipurile de cartof, supraviețuitoare ale marii epidemii din 1840 din Europa și America de Nord, sînt genitorii virtuali ai soiurilor cultivate ulterior. În acest fel baza genetică s-a restrîns, dar aceasta a constituit o barieră, mai mult sau mai puțin impenetrabilă pentru mană și alte boli. Ameliorarea modernă, extinsă pe ultima sută de ani, a produs o grupă de soiuri ce sînt similare genetic, dar neasemănătoare în răspunsul lor la continuarea selecției pentru producție, care a crescut în acest răstimp de peste 5 ori. Introducerea de material genetic nou a fost limitată mai ales la gene majore pentru rezistență la boli, cum sînt genele *R* (9) pentru rezistență la mană din specia sălbatică de cartof *Solanum demissum* ($2n = 6n = 72$ cromozomi, în timp ce cartoful cultivat aparține speciei tetraploide *S. tuberosum*, cu $2n = 4x = 48$). Specia *S. demissum* posedă gene de rezistență și la rîia neagră, rhizoctonia, și la unii viruși, la gîndacul din Colorado și heterodera, precum și la temperaturi scăzute. Unele soiuri vechi, care în deceniul al VI-lea și începutul deceniului al VII-lea, ocupau suprafețe întinse în S.U.A. și în alte țări, sînt donori excepționali pentru rezistență la boli: Russet Burbank (în 1970 ocupa — 28,1% din suprafața cu cartof a S.U.A., este rezistent la rîia comună și virusul Y), Kénnebec (20% din suprafață, rezistent la mană, fusarium, rîia neagră și 3 viruși), Katahdin (15,3% din suprafață, donor de rezistență la 6 boli) și altele[1].

Unele dintre soiurile de cartof create la noi sau introduse din alte țări — Oldina (1976), foarte susceptibil la mană; Ostara (1968), Jaerla (1971), Muncel (1975), omologate sau admise în producție și ele susceptibile la mană; iar Colina (1960), Măgura (1961) și Désirée (1968), potrivit de susceptibile la mană — impun protecția prin stropiri cu produse

[1] *Genetic Vulnerability of Major Crops*, în „National Academy of Sciences“, Washington, D.C., 1972.

fungice, care se adaugă la tratamentele cu insecticide, ce produc poluarea producției și a mediului.

O altă epidemie, rugina arbustului de cafea, produsă de ciuperca *Hemileia vastatrix*, a devastat culturile de cafea din Ceylon. În anul atacului, 1870, această insulă ocupa în lume locul prim în producția de cafea exportînd anual 100 milioane funzi (un fund = 0,453 kg). Consecințele: Banca Orientală a dat faliment, iar englezii au devenit o națiune băutoare de ceai. Altă consecință a fost introducerea plantelor de cafea în America de Sud, prin folosirea unor butași recoltați din plante susceptibile, la rugină, dar libere de agenții patogeni ai ciupercii. Așa s-a dezvoltat cultura cafelei pe alte meleaguri ale globului, iar economia unor țări, devenind dependentă de această cultură (Brazilia, Columbia...), a prosperat la rîndul ei, în lipsa agentului patogen al ruginii, pînă în 1969, cînd boala s-a manifestat în formă epidemică, mai ales în Brazilia.

Insecta filoxera, *Phylloxera vastatrix*, originară din America, a devastat vița de vie europeană pe rădăcină proprie, începînd cu 1863 în Anglia și Franța. Venită tot din America, în 1878, mana viței de vie, *Plasmopara viticola*, a atacat puternic podgoriile, astfel că după cinci ani, majoritatea viilor nobile, producătoare de struguri de masă și vin, de-a lungul și de-a latul Europei, erau invadate de această ciupercă. Mai recent, cea mai distrugătoare epidemie a fost helmintosporioza, produsă, în 1942, de ciuperca *Helminthosporium oryzae*, care a devastat culturile de orez în zona Bengal, India, determinînd în anul următor moartea a zeci de mii de oameni prin înfometare.

Din fericire pentru podgoreni, s-a descoperit că vița de vie americană este imună la filoxeră, iar cercetătorul Kobber a propus o măsură profilactică universal eficace: altoirea soiurilor de viță europeană pe portaltoi de viță americană. Pentru combaterea manei s-a propus stropirea plantelor de viță de vie cu soluție de sulfat de cupru neutralizată cu var (zeamă bordoleză). Spre deosebire, împotriva helmintosporiozei orezului nu au fost aflate remedii imediate de combatere și, ca și în cazul altor boli, cum sînt: ruginile și făinarea cerealelor, a manei, ruginilor, antracnozei etc. a fost ținută doar sub un control biologic, prin introducerea în

cultură a unor genotipuri mai tolerante sau mai rezistente. Abia prin deceniul al VI-lea s-a luat în considerație folosirea controlului chimic prin aplicarea pesticidelor.

Uniformitatea genetică și pericolele prezentate de aceasta în fața epidemiilor a fost ilustrată, către anii '70, de un fenomen deosebit de grav ale cărui efecte au fost și sînt resimțite în întreaga lume: este vorba de pătarea și arsura frunzelor — helmintosporioza porumbului, produsă de ciuperca *Helminthosporium maydis*. Această boală este de mult cunoscută, dar la porumb ea nu s-a manifestat niciodată exploziv. (Din același gen, mai dăunătoare părea a fi pătarea cenușie sau arsura frunzelor, produsă de specia *H. turcicum*). Iată, însă că în 1962 a avut loc în Filipine un atac masiv de *H. maydis*, atac care a parazitat și distrus culturile cu hibrizi de porumb F_1 și multe dintre liniile consangvinizate. Faptul că, la descoperire, epidemia era localizată la porumbul din Filipine, și pentru că nu a fost efectuată o analiză genetică, a determinat pe specialiști să catalogheze atacul ca pe un caz particular, drept „fenomen filipinez", și să-l treacă cu vederea. Dar, după semnalarea atacului, agentul patogen, transmis prin vînt, s-a răspîndit în numeroase alte zone cultivatoare de porumb, producînd însemnate pagube. Astfel, în 1970, în S.U.A., helmintosporioza a distrus pînă la 50% din producția de porumb a unor state din sud-est, cu o diminuare medie a producției de porumb a S.U.A. cu 15%. Marile resurse ale agriculturii americane au împiedicat producerea unei catastrofe, dar pierderile, prin cauzele lor, au reprezentat un grav semnal de alarmă și un pericol potențial pentru cultura porumbului pe plan global.

Cercetările întreprinse, bazate pe analiza genetică, au evidențiat un fapt dintre cele mai ciudate și anume că agentul patogen a atacat toți hibrizii de porumb și liniile consangvinizate cu citoplasmă sterilizantă de tip Texas (T), transferată în genitorii materni pentru inducerea sterilității mascule, în vederea înlăturării castrării manuale în producerea seminței hibride comerciale F_1.

Porumbul obișnuit, cu polenizare liberă, ca și unele linii consangvinizate cu citoplasmă normală nu era atacat de helmintosporioză. Studiul comparativ al agentului patogen dezvoltat pe porumbul hibrid îmbolnăvit (cu citoplasmă T),

cu agentul dezvoltat pe porumbul cu citoplasmă normală (N) a permis să fie identificată o nouă formă, o nouă rasă, de *H. maydis*, denumită rasa T, care atacă porumbul cu citoplasmă Texas.

Atacul în masă cu helmintosporioză a porumbului hibrid produs prin castrare genetică, la nivelul unor țări, și chiar la nivelul unor regiuni ale globului, este prima dovadă clară cu privire la ereditatea susceptibilității în această boală prin citoplasmă T. Probabil, în citoplasma acestui porumb, alături de mutația plasmagenei care induce sterilizarea polenului, a apărut o mutație în altă plasmagenă (sau prima plasmaalelă mutantă are efecte pleiotrope și afectează ambele caracteristici), care se comportă recesiv față de alela mutantă, ce conferă virulență noii rase de *H. maydis*, parazită pe porumbul cu citoplasmă T. Atacul masiv a impus eliminarea liniilor cu citoplasmă mascul sterilă de tip Texas din sistemul de producere a seminței hibride de porumb. Însă, la sămînța de porumb hibridă F_1, cu sporuri însemnate și stabilitate mare a producției de boabe, nu se putea renunța. Ca urmare, a trebuit să se apeleze la linii consangvinizate în citoplasmă normală și să se revină la sistemul de producere a seminței hibride prin castrarea manuală a plantelor din liniile materne și a plantelor hibrizilor simpli materni în cazul producerii seminței hibride duble). Acest sistem implică cheltuieli mari pentru forța de muncă folosită la îndepărtarea paniculelor plantelor genitorului matern. Neajunsul cel mai mare îl reprezintă însă faptul că rareori castrarea este desăvîrșită. Astfel, sămînța comercială F_1 nu este hibridă 100%, fapt ce determină reduceri severe ale producției de boabe.

Potrivit cercetărilor, cele două ciuperci menționate, din genul *Helminthosporium*, care atacă porumbul, sînt adaptate zonelor cu climat umed și cald. De exemplu, chiar *H. turcicum*, mai păgubitoare în condițiile climatului temperat, în anii ploioși, are o temperatură optimă de germinare cuprinsă între 25—30°C (maxima la 33—35°C), iar durata incubației, care depinde de t° este de 9 zile la 22°C și de 7 zile la 29°C. Or, *H. maydis* caracteristică Filipinelor, localizate aproximativ între paralelele 8—18° latitudine nordică (deci la tropice) au climat cald și foarte umed, iar statele din sudul S.U.A. în care atacă helmintosporioza sînt situate

la sud de paralela 35°, riverane oceanului și bazinului fluviului Mississippi. Rezultă că *H. maydis*, rasa T, se dezvoltă în regiuni umede și foarte calde. Acolo era firesc să se renunțe la citoplasma sterilizantă de tip Texas și să se revină la castrarea manuală. Însă renunțarea la citoplasma T în România, în 1976, nu a fost oare o păgubitoare pripeală? Faptul că în țara noastră, producția medie la hectarul de porumb în 1977 și 1978 a scăzut cu 12, respectiv 6 procente, față de 1976, cînd s-a mai folosit sămînța hibridă F_1, în citoplasmă T, nu se datorează oare și castrării manuale necorespunzătoare?

Cele cîteva exemple menționate ca și multe altele consemnate de istorie, dar mai ales de memoria oamenilor sînt în măsură să demonstreze că uniformitatea genetică creează condiții optime pentru specializarea și înmulțirea masivă a patogenilor. Această situație a făcut ca în lipsa unor soiuri rezistente la boli și dăunători și în lipsa unor mijloace de cultură curative salutare, să se apeleze și să se extindă protecția chimică a culturilor prin folosirea pesticidelor. Descoperirea D.D.T.-ului (diclordifeniltricloretanul), substanță organoclorurată ieftină și, aparent, nedăunătoare pentru sănătatea omului, a trezit speranța că cel puțin împotriva principalelor insecte s-a găsit un remediu. Dar ce deziluzie! Se știe că după 1963, în urma sesizării pericolelor reprezentate pentru om și mediul înconjurător de D.D.T. (doza letală DL_{50} = 300—500 mg/kg om, omoară 50% din indivizii expuși) și de alte insecticide organo-clorurate (Aldrin, cu DL_{50} = 38—67 mg/kg; Heptaclorul, cu DL_{50} = 40 mg/kg) și organo-mercurice (Etilparathionul cu DL_{50} = 3,6 mg/kg oral și DL_{50} = 4—35 mg/kg cutanat; Metilparathionul, cu DL_{50} = 12—15 mg/kg etc.), fiind foarte toxice și remanente, a avut loc scoaterea sau reducerea utilizării acestora și căutarea unor substituenți mai selectivi, cu toxicitate și remanență cît mai redusă.

În prezent, culturi cum sînt vița de vie, pomii fructiferi, culturile din sere, mazărea, porumbul, cartoful, ș.a. depind total sau în bună măsură de utilizarea pesticidelor. De exemplu, protecția împotriva epidemiilor a unei livezi intensive sau a unor culturi din seră, impune efectuarea într-un an sau un ciclu de producție a minimum 10—15 tratamente

diverse cu substanțe chimice cu efecte nocive asupra florei și faunei dăunătoare. Partea deosebit de negativă constă în faptul că, de la o etapă la alta, numărul tratamentelor, cantitatea și tipul substanțelor protectoare trebuie să sporească din cauza creșterii toleranței paraziților sau apariției unor rase mutante rezistente la substanțele chimice în uz. Este util de menționat că dăunătorii, bacteriile și ciupercile parazite au o capacitate remarcabilă de a produce mutante care pot detoxifica sau transforma substanțele chimice toxice. Adăugarea la fungicide și insecticide și a erbicidelor, precum și a unor cantități ridicate și excesive de îngrășăminte chimice, în special cu azot, iar în anumite situații și a unei irigări excesive și a monoculturii, ne permite să ne reprezentăm, între anumite limite, faptul că agricultura actuală atunci cînd nu se realizează pe baza recomandărilor științifice riguroase este asociată strîns cu poluarea mediului și o producție neigienică, efecte care prezintă pericole atît pentru echilibrul medinlui ambiant cît și pentru sănătatea omului.

POTENȚIALITĂȚI ȘI LIMITE

Caracteristic pentru genetica clasică este influențarea și restructurarea indirectă și întîmplătoare a genotipurilor, genomilor și genelor. Asupra variațiilor genetice, apărute spontan sau indus (prin: mutație genică, autopoliploidie, hibridare intraspecifică și interspecifică, și hibridare interspecifică urmată, fie de dublarea cromozomilor — alopoliploidie, fie de restructurarea cromozomilor — dislocație) se acționa prin selecție artificială, care orientează evoluția în interesul omului, tot așa cum a fost și este orientată evoluția biologică de selecția naturală. Marele merit al geneticii clasice derivă din faptul că, pe baza cercetării structurii genetice a populațiilor diverselor specii, în funcție de sistemele de reproducere, a formulat principiile teoretice ale selecției artificiale, care explică eficiența sau ineficiența progresului în ameliorarea speciilor vegetale cultivate.

Prin acțiunea sau presiunea pe care selecția artificială o exercită asupra organismelor variabile sînt favorizate anumite gene utile și eliminate unele gene dăunătoare, nevaloroase și neutre (pot fi eliminate și unele gene valoroase care controlează caracteristici neexpresate fenotipic sau strîns linked cu gene cu efecte fenotipice negative). Indiferent de originile variațiilor genetice, separarea, prezervarea și înmulțirea noilor forme impune aplicarea unei selecții adecvate sistemului de reproducere și structurii genotipurilor.

Explorarea variațiilor spontane sau induse și exploatarea acestora prin aplicarea modalităților adecvate de selecție, sînt premise și modalități de intervenție asupra substanței ereditare în vederea dezvoltării unor noi forme de plante — soiuri — care să servească mai bine omul. Manipularea deliberată, dar indirectă, prin hibridare controlată și selecție, a genelor, cromozomilor, nucleilor și citoplasmelor, pentru a produce combinații noi, mai valoroase de caracteristici ereditare, reprezintă tehnici de „inginerie genetică" aplicată în condiții de păstrare a integrității organismelor, asigurarea realizării ciclului normal de viață. Soiurile și hibrizii cultivați în prezent, cu unele excepții, reprezintă o reflectare a aplicării metodelor convenționale (clasice) de manipulare genetică și ameliorare.

Munca de creare a noilor soiuri o ecuație cu multe necunoscute

Noile soiuri reprezintă realizări cu efecte binefăcătoare excepționale pentru societate. Fiecare soi este o creație nouă, un organism original, o invenție unică prin genele pe care le posedă, prin interacțiunile dintre acestea, prin integrarea și folosirea condițiilor de mediu în realizarea propriilor caracteristici.

De aceea, un soi, prin tehnicile convenționale de ameliorare, se dezvoltă într-un timp îndelungat. Chiar și cînd cercetătorul diminuează durata prin realizarea cîtorva generații în condiții de fitotron și seră, timpul de creare, de exemplu, a unui soi de grîu, este încă mare, de ordinul a 10—12 ani. Deci, trebuie să se aștepte în medie 10 ani pentru

a se vedea rezultatele ameliorării, timp în care se cheltuiesc mulți bani pentru ca, uneori, să nu se „recolteze" nimic. Aceasta presupune munca unei echipe de cercetători în domeniile geneticii, protecției plantelor, biochimiei etc.

Un organism nou, superior genitorilor și mai folositor prin produsele sale, presupune că cercetătorul care-l creează trebuie să înțeleagă atît legile evoluției, cît și condiționarea genetică a caracteristicilor, să asocieze ansamblurile de gene corespunzătoare obiectivelor de realizat, să examineze și să trieze o cantitate uriașă de material, pînă ajunge la detectarea genotipului urmărit a fi modelat. În plus, s-a constatat că în țările cu agricultură avansată din vestul Europei durata vieții în cultură a unui soi este din ce în ce mai scurtă, în medie 3—4 ani, după care este înlocuit de un nou soi mai rentabil. Toate acestea implică din partea amelioratorului un efort mintal și fizic impresionant, care, rareori, este apreciat și răsplătit cum se cuvine. Din această cauză numărul amelioratorilor se reduce. De asemenea, de exemplu, în Franța, din 100 de soiuri înregistrate anual, doar cîteva (în medie 5) ajung să se răspîndească în cultură. O astfel de situație lasă prea puține șanse colectivelor mici, modest dotate, de amelioratori. Drept consecință, marile firme internaționale de produse chimice: Sandoz, Shell, Ciba ș.a. în goana lor după profit, s-au lansat în dezvoltarea cercetărilor de genetică, de creare a unor soiuri noi și de producere a seminței comerciale. Aceste firme, care produc și furnizează produse fitosanitare „terapeutice" pentru agricultură, se pare că au înțeles că viitorul nu mai este al chimiei, de a proteja plantele susceptibile la boli și dăunători, ci al creării unor plante rezistente.

În ultimii ani cererea de produse agricole pe piața mondială a sporit sensibil. Aceasta a făcut ca importanța agriculturii să crească și să se vorbească despre ea ca despre „puterea verde", „aurul verde"... Aceste denumiri, folosite în limbajul vest-europenilor, dezvăluie atît rolul agriculturii în societatea actuală, cît și tendința acestor țări de a reduce pe cît posibil importul de produse agricole.

Guvernanții, planificatorii, întreprinzătorii din aceste țări au ajuns însă la concluzia că sporirea producției agricole

și creșterea ponderii ei este strîns legată de inovarea ei pe baza cercetării științifice și modernizarea tehnologiilor. Ca urmare, în țări ca: Franța, Olanda, R.F.Germania cît și în Japonia etc. și bineînțeles în S.U.A., statul și diferite companii fac investiții masive în cercetarea științifică legată de agricultură. În Franța, pentru orientarea agriculturii, cercetătorii au propus ca soluții de viitor: „În sus, o selecție genetică foarte sofisticată (pentru crearea de plante noi), în aval, o mai bună valorificare a deșeurilor (prin crearea unor microorganisme capabile să transforme în alimente sau energie munții de deșeuri)". (Despre realizările în crearea sau detectarea unor genotipuri noi au fost făcute unele precizări în paragrafele anterioare, în timp ce „domesticirea microorganismelor" va fi prezentată în alte capitole).

Socotesc totuși utilă precizarea că una dintre sarcinile importante ale cercetării științifice din agricultură, în țara noastră, constă în crearea unor organisme noi cu însușiri superioare celor actuale, prin metode speciale de genetică. Sarcina a fost subliniată de președintele Nicolae Ceaușescu la consfătuirea de lucru de la Comitetul Central al P.C.R., din zilele de 9 și 10 septembrie 1981, cu cadrele din cercetare și învățămînt din agricultură, industrie alimentară, silvicultură și gospodărirea apelor. Printre altele a spus: „În mod deosebit este necesar să crească rolul geneticii, al ingineriei genetice, al biochimiei și altor discipline, care au un rol hotărîtor în realizarea de mutații și schimbări revoluționare în structura plantelor și animalelor, deci în realizarea unor soiuri și animale cu caracteristici superioare, care vor asigura realizarea revoluției agricole, a revoluției în știința agricolă"[1]. A fost de asemenea menționată necesitatea cercetării unor aspecte menite să contribuie la mărirea capacității plantelor de asimilare a energiei și de conversie, pentru intensificarea metabolismului la animale în vederea asigurării sporirii gradului de asimilare a furajelor și reducerea consumurilor etc.

[1] Ceaușescu N. *Cuvîntare la Consfătuirea de lucru de la C.C. al P.C.R. cu cadrele de cercetare și învățămînt din agricultură, industria alimentară, silvicultură și gospodărirea apelor* 10 IX 1981, pag. 25, Edit. Politică, București 1981.

În general, în țara noastră, în rețeaua de institute și laboratoare din domeniul științelor biologice, cercetările sînt orientate atît spre cunoașterea unor aspecte ale fenomenelor vitale în vederea folosirii rezultatelor pentru crearea unor organisme noi, mai utile, cît și pentru cunoașterea organismului uman, a interacțiunilor acestuia cu mediul, în vederea păstrării sau apărării sănătății oamenilor.

Dintre realizările relativ recente ale geneticii merită menționate unele din domeniile mai noi ale cercetării: al speciilor proteice, al extinderii sortimentului de plante alimentare și al perfecționării tehnicilor de prelucrare a plantelor (aceste aspecte se regăsesc în capitolul „Agricultura neconvențională").

În loc de concluzii

Cunoașterea mecanismelor genetice și intervenția deliberată în genotipul diverselor organisme utile face ca munca de obținere a unor soiuri și hibrizi noi să devină o acțiune eficientă, eliberată de amatorism și incertitudine. Inducerea unei largi și valoroase variații genetice, relevarea genelor și a funcției acestora în genotip propriu și în alogenotipuri, precum și stabilirea metodologiilor adecvate de intervenție asupra plasmei germinative a făcut din genetica clasică nu numai un instrument de cunoaștere și acțiune în îmbunătățirea formelor cultivate, dar a asigurat și premisele apariției și dezvoltării geneticii moderne, care permite acționarea directă asupra genelor, sau a unor segmente din acestea. Genetica s-a afirmat nu numai ca o știință a eredității, variabilității și reproducerii organismelor, ci și ca o știință și artă a schimbării acestor trei proprietăți ale viului. Astfel, s-a dezvoltat „genia" sau „geniul genetic" și alte tehnici de genie biologică, care nu mai reprezintă doar o curiozitate de laborator, ci o industrie care se dezvoltă rapid.

Progresul geneticii, al cunoștințelor noastre asupra structurii, continuității și schimbării, după plan, a viului, survine într-un moment cînd noi avem cele mai mari nevoi: necesitatea de a hrăni tot mai mulți oameni și necesitatea de a suplini reducerea resurselor energetice provenite din biomasa fosilă neregenerabilă. Singură genetica, prin uriașele sale posibilități, oferă mijloacele satisfacerii acestor mari nevoi ale omenirii.

Fenomenele vii sînt de o complexitate extremă, ca urmare, atît cunoașterea acestora, și cu atît mai mult sinteza unor organisme noi, este mai mult decît dificilă, pentru că geneticianul face într-un timp deosebit de scurt ceea ce natura a făcut în zeci de mii sau în milioane de ani. Evoluția și-a modelat produsele în natură, în procesul luptei pentru existență, favorizînd supraviețuirea celor mai adaptați indivizi — specii. Genetica imită natura, dar ea folosește tehnologii „blînde" aplicate nu asupra unor specii în interesul biologic al acestora, ci asupra unor „cărămizi": gene, cromozomi, genomi, cu ajutorul cărora inventează genotipuri noi, a căror superioritate nu se evidențiază în lupta pentru existență, ci în competiția de a fi cît mai utile pentru om, pentru oameni. Majoritatea lor inventează noi organisme, dar cum am văzut, dintre soiurile înregistrate oficial în fiecare an numai un număr mic au succes în producție.

Se poate recunoaște că „privilegiul" de a inventa organisme noi se cîștigă pe baza unei pregătiri științifice și tehnice deosebite, îndelungate și pasionate și a unei munci susținute și ingenioase de manipulare conștientă a structurilor înzestrate cu funcții ereditare. O asemenea muncă este de durată.

II

IMENSELE POSIBILITĂŢI ALE INGINERIEI GENETICE

PREMISE ALE SINTEZEI UNOR GENOTIPURI HIPERPRODUCTIVE

Crearea într-o perioadă scurtă a unor soiuri cu un potenţial productiv mai mult decît dublu comparativ cu soiurile actuale şi care să depăşească constant producţiile medii actuale cu 50—100% impune revoluţionarea a tot ceea ce implică analiza genetică şi manipularea genelor. Numai astfel se vor realiza soiuri superproductive, care în condiţii de mediu considerate în prezent normale (deci fără investiţii suplimentare). ce asigură cerinţele genotipului, vor realiza, obişnuit, la hectar, la grîu 8 000—10 000 kg, la porumb 12 000—15 000 kg, la floarea-soarelui şi soia 4 000—5 000 kg, la sfecla de zahăr 80 000—100 000 kg etc.

Dublarea capacităţii de producţie la soiurile speciilor cultivate presupune o lărgire masivă a variabilităţii genetice, inclusiv prin inducere experimentală a mutaţiei genelor şi utilizarea unor strategii de ameliorare care să permită operarea cu o bună parte sau cu majoritatea fondului de gene şi plasmagene existent la plantele superioare cultivate sau spontane, şi chiar la procariote şi animale. În asemenea condiţii se poate aştepta o interschimbare sau complexare a materialului genetic, precum şi sinteza experimentală a unor organisme complet noi. Noile combinaţii genotipice pot avea importanţă economică şi agronomică doar în cazurile în care funcţiile genelor şi plasmagenelor asamblate artificial se coadaptează formînd un tot unitar, eficient şi cu randament sporit, cu capacitatea de a folosi condiţiile concrete ale mediului de viaţă. O bună adaptare a noilor genotipuri (caracterizate eventual şi printr-o arhitectură îmbunătăţită), de exemplu, la condiţiile din ţara noastră, ar urma să se manifeste printr-o asimilaţie şi creştere intensă în primele săptămîni de vegetaţie, interceptarea luminii solare cu un randament sporit la temperaturi scăzute, potenţial celular fotosintetic ridicat la temperaturi suboptime, capacitate prelungită şi sporită de înmagazinare a substanţelor de rezervă, insensibilitate la lungimea zilei, formarea sincronă a primordiilor florilor şi fructelor, rezistenţă la climat aspru, la boli şi dăunători etc.

Obiectivul geneticii aplicate în agricultură este crearea unor genotipuri mai productive. Deci selecţia pentru productivitate rămîne în prim plan. Dar, productivitatea este rezultatul unui ansamblu complex de acţiuni şi interacţiuni genice, care controlează reacţii biochimice şi procese fiziologice, ce se succed şi se intercondiţionează în realizarea fenomenelor din ciclul vital. Ca urmare, cu cît se va adînci cunoaşterea structurii, funcţiei şi tehnicilor de manipulare a genelor implicate, direct şi indirect, în realizarea fenotipului, cu atît se vor lărgi perspectivele sintezei unor organisme hiperproductive.

Geniul genetic

Obţinerea, în 1930, pe baza hibridării sexuate între grîu şi secară a primului amfiploid de tip *Triticale* a contribuit la naşterea unor vise mărețe: fabricarea de specii complet noi şi transferul în speciile cultivate a rusticităţii, rezistenţei şi vitalităţii caracteristice speciilor sălbatice. Barierele reprezentate de diferenţele în morfologia gameţilor, în structura citoplasmelor şi cromozomilor, în balanţa genelor etc. au făcut însă ca această metodă: — hibridarea sexuată supraspecifică—, în care s-au pus atîtea speranţe, să permită obţinerea doar a unor rezultate minore comparativ cu interesele manifestate şi eforturile depuse. Liniile extrase din combinaţii hibride supraspecifice, după prelucrarea adecvată a descendenţilor (poliploidizare, backcross etc.), nu ating aproape niciodată performanţele genitorilor cultivaţi implicaţi sau formează organe care nu corespund, mai mult sau mai puţin, exigenţelor tehnologiilor obişnuite de cultură.

Visul „fabricării" unor specii hibride și transferul controlat al determinanților ereditari doriți, imposibil de realizat prin tehnicile geneticii clasice (bazate pe hibridarea sexuată) este posibil de transformat în realitate prin aplicarea la plantele cultivate a unor tehnici complexe de acționare asupra plasmei germinative. Aceste tehnici au fost elaborate pe baza cercetării microorganismelor, în special a bacteriei *Escherichia coli* (microorganism unicelular, procariot, a cărui nucleu netipic — nucleoidul, este constituit dintr-un singur cromozom — genoforul, cu structură haploidă și care se divide direct nu prin mitoză sau meioză).

Tehnicile care asigură manipulările genetice în afara proceselor sexuale reprezintă o adevărată industrie care se dezvoltă rapid și care a căpătat numele de *inginerie genetică*.

Utilizarea practică a cunoștințelor de genetică și a tehnologiei genetice în modelarea unor genotipuri noi, în interesul umanității, este indicată prin denumirea de „geniu genetic" (de la lat. *genere, gignere*, a produce, a genera). În acest caz, termenul „geniu" putem afirma că îmbină conținutul definițiilor din psihologie și tehnică, relevînd: cea mai înaltă înzestrare mintală științifică și cea mai ridicată capacitate inventivă și creativă tehnică în stare să schimbe natura intervenției umane în modelarea unor organisme originale, care îmbogățind lumea vie vor produce un impact asupra societății.

Ingineria genetică are două nivele majore: 1. nivelul celular care implică cultura *in vitro* a celulelor și hibridarea somatică a celulelor și 2. nivelul molecular care implică manipularea directă a ADN sau ARN viral.

MECANISMELE INGINERIEI GENETICE

Transferul și recombinarea materialului genetic la bacterii se realizează direct prin *transformare* și indirect prin *conjugare* și *transducție* cu ajutorul unor vehicule originale: plasmidele și virușii.

Transformarea bacteriilor

Penetrarea într-o celulă a ADN originar dintr-o altă celulă genetic diferită și schimbarea unor caracteristici ereditare din celula primitoare (recipient) cu unele caracteristici de la celula donatoare (donor) aduse de ADN exogen a căpătat denumirea de *transformare*.

Fenomenul transformării a fost descoperit la bacterii, pe baza cercetării agentului pneumoniei. *Pneumococcus pneumoniae*. Această specie conține două tipuri distincte de indivizi: tipul sălbatic sau „S", patogen sau virulent (pe mediu de cultură produce colonii cu suprafața bombată și netedă, cu marginile perfect circulare; *Smooth* — neted) și tipul mutant sau „R", nepatogen, avirulent (produce colonii cu marginile crenelate, rugoase; *Rough* — rugos, aspru. Fiecare tip conține genotipuri detectabile serologic). În 1928, microbiologul englez F. Griffith a inoculat la șoareci o suspensie de pneumococi vii, nepatogeni, de tipul R II (avirulent, acapsulat), cu pneumococi de tipul S III (patogen, capsulat) omorîți prin tratare termică. Rezultatul: șoarecii s-au îmbolnăvit și au murit, iar din sîngele lor au fost izolați pneumococi capsulați de tip transformat S III. Fenomenul a fost explicat, în 1944, de echipa microbiologului american O.T. Avery, care a identificat substanța transformatoare. Aceasta este constituită din ADN, de unde concluzia că substanța transformatoare și substanța eredității este una și aceeași — acidul dezoxiribonucleic. Pentru confirmare ei au purificat ADN extras de la tipul S III și l-au folosit ca substrat *in vitro* pentru creșterea tipului R II. Și în acest caz recipientul s-a transformat în direcția donorului. Transformarea este ereditară, deoarece ADN, cu gena *S* de la donor, se încorporează, printr-un crossing over, în cromozomul bacterian recipient în locul genei *R*.

Fenomenul transformării a fost indus la circa 20 de specii de bacterii. Aceste realizări au generat concluzia că transformarea are loc la o greutate moleculară minimă de ADNT pur (T-transformator) de circa 10^5. Procesul de transformare experimentală la bacterii presupune cîteva momente: 1. extragerea ADNT de la donor a cărui cromozom se rupe în fragmente mari, de 10 000—20 000 perechi de nucleotizi,

care includ cîteva gene (o genă de mărime medie are circa 1 200 perechi nucleotizi); 2. penetrarea de către ADNT a peretelui și membranei celulare a bacteriei recipient; 3. încorporarea și fixarea fragmentelor de ADNT de cromozomul bacteriei recipient; 4. împerecherea și sinapsa fragmentelor de ADNT cu regiunea homologă din cromozomul circular al recipientului (astfel, în această regiune, apare un segment cu o structură diploidă, cromozomul bacterian fiind haploid); 5. crossing over și schimbul reciproc între segmentele homologe de la donor și recipient; 6. replicarea noului cromozom recombinat și segregarea transformanților.

Conjugarea

Este un proces caracteristic bacteriilor și constă în transferul unor segmente de material genetic de la o celulă la alta, prin realizarea unui contact strîns între cele două celule și formarea unui „canal de conjugare". Prin acest canal, materialul genetic de la celula „donor" trece în celula „receptor". Transferul genetic prin conjugare este condiționat de prezența în celulele donor a unei structuri *episomice* și anume a *factorului de sex* sau *fertilitate*, simbolizat „F". Acesta posedă informația genetică pentru formarea „perechilor de recombinare" și a „canalului" prin care are loc transferul unidirecțional al genelor de la donor la receptor.

Ce sînt plasmidele și episomii? Bacteriile posedă un cromozom circular unic, haploid, în care este înscrisă informația genetică corespunzătoare funcțiilor esențiale ale celulei. În plus, unele bacterii posedă și elemente genetice suplimentare, neesențiale pentru viața celulei, dar de importanță majoră pentru cercetările de genetică, medicale etc. și anume plasmidele și episomii. Noțiunea de „plasmid" are un sens mai larg și indică toate formațiunile genetice extracromozomale din celula bacteriană. Principial, au formă circulară și sînt mult mai mici decît cromozomul bacterian, iar molecula de ADN inclusă conține circa 300 000 perechi de nucleotizi (circa 2% față de cromozomul bacterian).

Plasmidele propriu-zise, localizate în citoplasma celulei bacteriene se găsesc *numai în stare autonomă* (niciodată nu

se includ în cromozomul bacteriei). Printre acestea sînt factorii „R", „col" și „F".

Factorul sau complexul „R" (rezistență) în molecula circulară de ADN conține gene pentru rezistență la unele antibiotice și chimioterapice (streptomicină, cloramfenicol, tetraciclină, sulfamide), precum și gene pentru replicarea autonomă în citoplasmă, independent de cromozom și pentru transferul de la o celulă la alta. Factorul „col" conține genele pentru capacitatea de a sintetiza „colicine" (bacteriocine), proteine bactericide pentru bacterii înrudite, receptive. Factorul „F" se găsește „atașat" de membrana citoplasmică la nivelul unui „situs" (poziție) replicator, în apropiere de „pilii sexuali de tip F", care sînt „conducători" pentru materialul genetic ce este transferat (prezența pililor F, spre deosebire de cili, este determinată genetic de factorul F). Transferul plasmidelor de la o celulă la alta se realizează în timpul conjugării.

Plasmidele nespecifice sau episomii sînt plasmide cu o comportare particulară. Episomii au proprietatea de a exista în celulă în două stări alternative: *autonomă,* liberi în citoplasmă și *integrată* în cromozomul bacterian. În primul caz, cînd se comportă ca plasmide propriu-zise, replicarea episomilor este independentă de ritmul diviziunii celulare și de aceea ei pot ajunge la un număr mare în celulă; în al doilea caz, episomul se multiplică sincron cu cromozomul în care s-a inserat (la 15—50 minute). Integrarea se realizează prin deschiderea celor două inele: cromozom și episom, printr-un mecanism de rupere — schimb asemănător crossing over-ului, care permite reunirea lor prin extremități într-o singură formație de ADN dublu catenar circular. Deschiderea inelelor este caracteristică pentru același tip bacterian, întotdeauna în aceeași poziție, determinată de homologia locilor din cromozom și episom. Dintre episomi mai cercetați sînt *factorul de fertilitate „F"* și *bacteriofagii temperați* (simbiotici) sau *transductanți:* (lambda), P22 ș.a.

Conjugarea bacteriană și rolul factorului F. În raport cu acest factor pot fi: 1) bacterii lipsite de factorul F dau F^-, echivalente unor celule „femele", receptoare de material genetic; 2) bacterii F^+, în care episomii F sînt

autonomi, echivalente unor celule „mascule", donatoare de material genetic, inclusiv a factorului F; 3) bacterii „Hfr" (cu mare capacitate de recombinare) la care episomul F este integrat în cromozom; 4) bacterii „F" purtătoare ale unui episom „F", care după conjugare, la desprinderea din cromozom, a preluat și unele gene cromozomale. Un asemenea episom, autonom sau integrat, transmite prin conjugare și segmentul cu gene cromozomale, preluat din celula gazdă în ciclul de infecție anterior.

În timpul conjugării $F^+ \times F^-$, celula recipient (femelă F^-) primește factorul F , convertindu-se astfel în tip mascul F^+. Transferul acestui factor are loc în cîteva minute de la intrarea în conjugare a celor două tipuri de bacterii. La conjugarea Hfr $\times$ F^-, deosebite genetic, printre descendenți, testați pe diferite medii de cultură (minimal[1], complet, selectiv) au apărut alături de tipurile parentale și indivizi care recombinau genele — alele ale genitorilor. Frecvența recombinărilor este influențată de timpul cît durează conjugarea. Ca urmare, poziția genelor din grupul linkage (cromozomul) al bacteriilor poate fi stabilită prin simpla înregistrare a intervalului de timp necesar pentru ca diversele gene din cromozomul Hfr să pătrundă în celulă F^-.

Transferul genelor de la donor la receptor nu este un proces întîmplător. La începutul conjugării, cromozomul celulei Hfr se rupe la locul unde este integrat factorul F, fapt ce face ca din circular cromozomul să devină liniar. La nivelul ruperii este inițiată autoduplicarea cromozomului. Rezultă astfel doi cromozomi identici dintre care unul va trece integral sau parțial în celula F^-. Apoi, puntea citoplasmică dintre conjuganți (canalul de conjugare) este străbătută treptat, într-o ordine strictă, de materialul cromozomal de la donor, începînd cu punctul O (punctul de rupere sau de origine) care este specific pentru fiecare sușă Hfr și continuînd cu diverși loci în ordinea dispunerii lor în grupul linkage. Într-un interval de 50 minute are loc transferul tuturor genelor de la Hfr în F^-. După transferul episomului nu se mai transferă nici o genă fapt ce indică situarea acestuia la capătul celălalt, opus punctului O, al cromozomului Hfr. Obișnuit, transferul este incomplet, numai o parte din cromozomul Hfr ajunge în celula F^- înainte ca celulele conjugate să se despartă. Ca urmare, rareori se formează celule complet diploide, de regulă rezultă doar o diploidie parțială. La nivelul acestui segment diploid homolog are loc împerecherea și crossing over-ul. După schimbarea segmentelor omologe, cromozomii se separă, iar descendenții recombinanți vor fi tot haploizi.

[1] „Mediu minimal" conține numai glucoză și săruri anorganice. Pe un asemenea mediu trăiesc bacteriile de „tip sălbatic" sau „prototrofe" care au capacitatea să sintetizeze toate elementele necesare producerii proteinelor și acizilor nucleici. „Mediu complet" format din minimal plus un amestec complet de metaboliți-produși ai metabolismului — zaharuri, aminoacizi, acizi nucleici, baze azotate, vitamine, hormoni, substanțe de creștere etc. Mediul complet asigură condiții pentru viață bacteriilor mutante, „auxotrofe", defective nutrițional, care au pierdut capacitatea de a sintetiza enzime ce catalizează o reacție în producerea unui constituent celular. „Mediu selectiv" — mediu complet minus unul sau altul dintre metaboliți, un aminoacizd, o vitamină, o bază azotată etc.

Bacteriofagii temperați pot fi: *liberi* în citoplasmă, cînd sînt virulenți, se multiplică, produc particule virale mature și lizează celula bacteriană gazdă și *integrați* în cromozomul bacterian, stare în care se replică sincron cu cromozomul și celula gazdă, putînd da naștere unei clone celulare. (O asemenea celulă se numește *lizogenă*, acest fenomen de simbioză — lizogenie, iar genomul viral, fagic integrat în genomul bacteriei și lipsit de învelișul proteic, care-i dă maturitate, se numește *profag.)* Lizogenizarea conferă celulei gazdă imunitate la reinfecția cu același tip de virus.

Integrarea profagului în cromozomul bacterian este condiționată de existența în genomul viral (în ADN sau ARN viral) și cromozomul bacterian a unei regiuni mici homologe. Cele două structuri circulare (cromozomul fagic se circularizează asemenea cromozomului bacterian), se împerechează la nivelul segmentelor homologe — unde are loc o rupere simultană, urmată de reunirea extremităților libere. Ruperea — reunirea este un proces recombinatoriu similar crossing over-ului. Cînd lizogenia afectează o celulă bacteriană Hfr, după duplicare, concomitent cu fragmentul cromozomului bacterian ea transferă în celula F^- și profagul asemenea unui locus oarecare.

Spontan, în anumite circumstanțe, printr-un mecanism asemănător integrării, profagul se poate detașa de cromozomul bacterian, trecînd în ciclul litic, cu formarea unor particule virale mature urmată de liza bacteriei gazdă. S-a demonstrat însă că în momentul desprinderii, în schimbul porțiunii de cromozom bacterial homolog, care a determinat sinapsa la integrare, fagul preia din cromozomul bacterial o porțiune homologă foarte mică (1—2% din cromozom). Cînd un asemenea fag matur este adsorbit de o nouă celulă gazdă, el injectează în aceasta o dată cu ADN viral și fragmentul cromozomal bacterial pe care îl poartă. În celula bacteriană, tocmai acest fragment bacterial purtat de viitorul profag se împerechează cu cromozomul gazdei în poziția în care găsește homologie, integrîndu-se prin crossing over.

Transferul genelor bacteriene de la o celulă la alta, nu prin conjugare, ci, pasiv, prin intermediul fagilor temperați, se numește *transducție,* iar virusul vehiculator, *fag transductant.* În transducție, cromozomul fagului acționează asemenea episomului F integrat, asigurînd transferul de material genetic (una-două gene strîns linkage) de la o celulă bacteriană gazdă la alta. Deci fagii temperați sînt transportori de material genetic bacterian. Transducția a fost descoperită la *Salmonella typhimurium* la care a fost indusă de bacteriofagul temperat P22. Astfel, sușele mutante auxotrofe $met^{-}thr^{+}$ (nu sintetiza metionina dar sintetiza threonina) și $met^{+}thr^{-}$ (nu sintetiza threonina dar sintetiza metionina) dacă erau trecute separat pe mediu minimal mureau, prima din lipsa metioninei, a doua din lipsa threoninei. Cînd însă aceste două mutante erau cultivate împreună pe un mediu minimal (în lipsa conjugării dar în prezența bacteriofagului P22), s-a observat apariția în descendență a unor bacterii recombinante prototrofe (de tip sălbatic) $met^{+}thr^{+}$, care sintetizau atît metionina cît și threonina. Frecvența transducției unei anumite gene este de 1 la 1 000 000 celule bacteriene infectate. Frecvența cu care două gene sînt transduse împreună sugerează distanța relativă (tăria linkage-ului) dintre ele. Transducția poate fi întîmplătoare în privința genei transferate sau specifică.

Așadar „domesticirea" bacteriilor se realizează prin transformare indusă, ca și prin utilizarea controlată a plasmidelor reprezentate de episomi F (în bacterii Hfr) sau viruși temperați. Aceste mecanisme asigură includerea artificială în bacteriile recipiente a unor fragmente de ADN exogen, a unor gene cromozomale. Totodată s-au creat condițiile pentru relevarea poziției genelor marker în cromozomul bacterial. Pe această bază au fost stabilite hărțile genetice la unele bacterii, în primul rînd la *Escherichia coli.* Prin descoperirea plasmidelor R a fost posibilă transmiterea extrem de rapidă a rezistenței la antibiotice de la o sușă bacteriană la alta.

Aceste descoperiri, obținute în special prin cercetarea bacteriei *E. coli* și a bacteriofagilor caracteristici, au importanță esențială în dezvoltarea geneticii moderne. Grație lor, genele au putut fi izolate, purificate și apoi transmise la alte bacterii, inițiindu-se astfel „manipulările" genetice. Prin aceasta genetica bacteriană a devenit utilă înțelegerii geneticii umane. De exemplu, prin grefarea în cromozomul de *E. coli* a genelor umane este posibilă studierea funcțiilor acestora. În vederea grefării, ADN-ul cu gena dată se decupează cu precizie din cromozomul străin cu ajutorul enzimelor de restricție[1]. Acestea au proprietatea să secționeze bicatena de ADN în poziții specifice. Se pot astfel substitui „la cerere" fragmentele obținute, de exemplu, ADN uman cu ADN de la *E. coli.* În acest fel cercetările avînd ca obiectiv înțelegerea acțiunii genei au fost depășite, geneticienii fiind în stare să fabrice o ființă artificială ce poate fi exploatată pentru a produce ieftin substanțe utile. Pentru acest tip de cercetări a fost creată și folosită sușa K12 de *E.coli*, deosebit de potrivită și privilegiată pentru cercetări de genetică și manipulări genetice cu atît mai mult cu cît plasmidele sale nu se pot transfera la o altă bacterie.

---

[1] „Enzime" sau „endonucleaze de restricție". Primele numite de tip I au fost izolate din *E. coli* sușa K, de Meselson și Yuan (1968). Acestea interacționează cu o secvență nemodificată „de recunoaștere" din duplexul de ADN.

În 1970, Kelly și Smith, au izolat din bacteria *Haemophilus influenzae* Rd endonucleaze de restricție, numite de tip II, deosebite de tipul I, și care sînt de importanță fundamentală pentru manipularea ADN. Enzimele de tip II recunosc o secvență particulară anumită (țintă) într-o moleculă bicatenară de ADN, rup catenele polinucleotidice din cadrul acestei secvențe dînd naștere unor fragmente discrete de ADN cu o lungime și secvență definită.

PLANTE CRESCUTE ÎN EPRUBETĂ

Început de drum în cultura „in vitro"

Observația zilnică ne-a obișnuit să asociem creșterea plantelor de un substrat natural — solul. Tot așa sîntem obișnuiți să vedem plantele ca fiind alcătuite din: rădăcini, tulpini, frunze, flori și că înmulțirea lor se realizează prin sămînță sau unele organe vegetative, majoritatea specializate. Studiul microscopic relevă că toate aceste organe includ numeroase celule, fiecare contribuind la desăvîrșirea morfofiziologică a întregului, a corpului sau somei (lb. gr. *soma* — corp). Realizarea acestuia (creșterea) presupune, pe de o parte, un proces de citodiferențiere care constă în schimbarea graduală a funcțiilor și, eventual, a structurii și morfologiei unor celule față de celulele mamă sau celulele surori, iar pe de alta un proces de morfogeneză sau organogeneză, care constă în dezvoltarea organelor sau unor părți specifice ale organismului, pe baza diviziunii celulare și citodiferențierii. În cadrul țesuturilor, celulele, prin programul lor genetic, „recunosc" poziția lor în raport cu alte celule, realizînd o informare poziționată.

Alterarea profundă a fenotipului celulelor diferențiate, cu genotip comun, a generat credința că celulele vegetale existente într-un organism multicelular sînt astfel alcătuite încît pot să trăiască și să funcționeze doar în cadrul țesutului sau organului în care sînt integrate. Separarea din corpul plantei ar determina nefuncționarea celulei plantelor superioare. De aici concluzia că celulele plantelor pluricelulare, datorită diferențierii și specializării s-ar deosebi profund prin proprietățile lor de celula microorganismelor unicelulare înzestrată cu totalitatea funcțiilor necesare realizării unei vieți independente și înmulțirii. Primele îndoieli în această credință au fost manifestate în 1902, de botanistul german Haberlandt, care a încercat, fără succes, să cultive pe un mediu nutritiv artificial celule izolate din frunze.

Experiențele efectuate ulterior, dar mai ales descoperirea rolului auxinelor (substanțe de creștere a plantelor) și zaharozei, au asigurat, în deceniul 3, să fie puse la punct

unele tehnici care au permis descoperirea capacității unor celule și țesuturi prelevate de la plante superioare de a reconstitui în afara corpului, prin cultura pe mediu artificial, *in vitro*, organismul original. Astfel, în 1939, geneticienii Philip White, în S.U.A., Roger Gautheret și Pierre Nobécourt, în Franța, au realizat cu succes, independent, primele proliferări celulare *in vitro*.

În timp ce cercetătorul american a realizat *in vitro* cultura unor piese mici de țesut — explante, prelevate din tumoarea produsă de hibridul *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii* (care sintetizează auxine), plasate pe un mediu de agar ce conținea săruri minerale, zaharoză și extract de drojdie, cercetătorii francezi au realizat creșterea unor explante din rădăcină de morcov, pe un mediu sintetic complex alcătuit din săruri minerale, glucoză și factori care inițiază creșterea (aneurină — vitamina B_1, cisteină — produs de reducere a cistinei și acid β-indolilacetic — IAA sau heteroauxină).

Cercetările ulterioare au demonstrat că proliferarea celulară și regenerarea unei plante întregi sînt posibile datorită faptului că în procesul citodiferențierii informația genetică, moștenită de diverse celule de la celula zigot sau de la celula embrionară inițială, rămîne în general intactă, neschimbată, astfel că toate celulele formează un clon de celule cu un genotip echivalent. Așa se explică faptul că prin cultura de celule vegetale vii, prelevate din cele mai diverse țesuturi și organe ale unei plante are loc regenerarea aceluiași tip de plantă, identică cu planta mamă originală. Regenerarea *in vitro* dintr-o celulă diferențiată a unei plante întregi are la bază fenomenele de *totipotență*[1] și *dediferențiere*[2].

---

[1] *Totipotență* — capacitatea unei celule specializată ca, în urma separării dintr-un agregat de celule, să asigure dezvoltarea unui embrion complet, sau capacitatea unei celule meristematice (embrionare) de a se dezvolta, ca răspuns la prezența unor substanțe de creștere a plantelor, într-o celulă specializată.

[2] *Dediferențiere* — pierderea de către celule a caracteristicii de specializare formată în timpul proceselor de diferențiere și regresia spre o stare mai simplă, embrionară, capabilă să regenereze o plantă întreagă. A fost relevată cu precădere prin cercetarea culturii de celule și țesuturi *in vitro*.

Pentru inducerea diviziunii celulare, citodiferențiere și morfogeneză, explantele prelevate din plante întregi (din rădăcini, muguri, măduvă, frunze) ca și celule izolate (din frunze, polen, zigoți) se plasează în diferite recipiente de sticlă sau plastic, cu respectarea regulilor culturii *in vitro* a microorganismelor. Astfel, în recipiente se asigură:

1) un mediu nutritiv diferențiat, adecvat cerințelor explantului: pentru unele specii este suficient un mediu de cultură foarte simplu în timp ce pentru altele este necesar un mediu de cultură mai complex, suplimentat cu substanțe de creștere (în principal, auxine și citokinine) și substanțe nutritive (zaharuri, vitamine din grupa B, săruri minerale extrase în mod normal de rădăcini din sol etc.), care trebuie să asigure explantului toți factorii pe care îi furnizează planta întreagă;

2) condiții artificiale de asepsie totală atît a mediului de cultură și a explantelor care se inoculează, cît și a recipienților, instrumentarului și aerului din încăperea în care se lucrează, pentru a feri cultura de orice contaminare cu bacterii sau spori de ciuperci;

3) un climat perfect controlabil în privința luminii, temperaturii, umidității care să favorizeze incubarea, diviziunea și morfogeneza.

În ultimii cîțiva ani un număr însemnat de specii vegetale au fost cultivate *in vitro*. Aceasta a permis să se stabilească faptul că obținerea de calus (aglomerarea de celule nediferențiate) nu constituie o problemă dificilă. Eforturile sînt concentrate însă în direcția regenerării de plante întregi prin diferențierea celulelor calusului și morfogeneză. S-a constatat că plantele care regenerează ușor *in vivo* realizează regenerarea și *in vitro*. Au fost regenerate plante la diverse specii de Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Liliaceae, Iridaceae, Begoniaceae, Orchidaceae etc.

Succesul culturii *in vitro* a unor explante și celule vegetale disociate, în condiții comparabile acelora utilizate pentru microorganisme, a generat ideea deosebit de fecundă a aplicării în cercetarea și manipularea genetică a celulelor plantelor a unor tehnici și procedee analoage celor folosite la bacterii, care au contribuit la nașterea ingineriei genetice.

Biotehnologii vegetale în premieră absolută

Micromultiplicarea clonală industrială a soiurilor valoroase. Să ne poarte gîndul la un grup înrudit de plante cu o arhitectură a florii și a anexelor acesteia, de o rară gingășie și frumusețe, la orhidee. Fiecare din numeroasele genuri (450) și specii (peste 15 000) ale acestei familii se caracterizează prin alcătuiri florale care pot fi asemuite fără exagerare cu păsări ale paradisului, cu papagali sau cu tot ceea ce natura, prin inimaginabilele ei posibilități de creație a realizat mai sublim în domeniul frumosului și ornamentalului. Dar ce pardox! Pare că natura, surprinsă de reușita și unicitatea modelelor florale, în marea ei generozitate, le-a produs anume pentru încîntarea ochiului și îndemn la reverie, neglijînd menirea acestor organe, înmulțirea. Cu o mare frecvență, la aceste plante, staminele imită clopoței, pene mozaicate răzlețe sau picături strălucitoare de mărgăritar, puțin adaptate formării polenului, situate mult sub sau îndepărtate de un stigmat, adeseori plasat pe un pistil configurat și el spectacular. Acestea sînt stavile redutabile în realizarea polenizării, proces deosebit de rar la orhidee. Așa se face că nepolenizarea și nefecundarea afectează marea majoritate a florilor, fapt de altfel pozitiv deoarece conferă acestora prospețime și persistență îndelungată. În puține cazuri se formează capsule cu semințe, dintre care un număr extrem de mic (circa 5%) au capacitate de germinare. În plus, sînt necesare condiții de conservare și de mediu dintre cele mai îngrijite deoarece semințele își păstrează greu această capacitate și necesită o perioadă mare de timp pentru germinare și formarea plantelor. După cele relatate, încă o precizare: înmulțirea acestor plante se poate face numai prin semințe. În plus, plantele rezultate din semințe sînt hibrizi complecși, foarte heterozigote, dintre care puține au valoare comercială (din cauza florilor necaracteristice).

Iată marile dificultăți ale orhidoculturii și cauzele pentru care aceste flori au constituit un mare lux, fiind vîndute la prețuri exorbitante. Aceste motive au făcut ca în unele țări cultura și afacerile cu flori tăiate de orhidee să devină foarte

prospere. De exemplu, în Franța (după Morel, 1975)[1], afacerile cu orhidee au fost mai importante chiar decît cele realizate cu culturi de bază, cum este sfecla de zahăr. Valorificarea orhideelor reprezintă o reală sursă de venituri pentru țări tropicale, cum sînt Thailanda și Singapore (așa cum garoafele asigură venituri mari unor țări sud-americane: Columbia și Ecuadorul).

Anul 1964: francezul Georges Morel, publică în buletinul „American Orchid Society", lucrarea *Cultura de țesut. Modalitate nouă de propagare clonală a orhideelor.* În lucrare se precizează: cultura *in vitro* de meristem de orhidee permite o creștere de 5 la 10 ori a numărului de plante în fiecare lună. Aceasta înseamnă că în decursul unui singur an este posibil să se obțină dintr-un singur explant de meristem cîteva milioane de plante identice (aceeași tehnică se poate aplica și la alte specii floricole, cum este crizantema. La vița de vie în fiecare lună se pot realiza 5 clonări, astfel că prin cultura unui singur meristem se pot produce mai mult de 10 milioane de clonări pe an). Descoperirea realizată de Morel și colaboratorii săi (aplicată încă la începutul deceniului 60) a relevat că specii neînzestrate natural cu proprietatea regenerării vegetative, cum sînt orhideele, declanșează artificial neoformări de muguri prin plasarea în cultură *in vitro* a unor meristeme sau muguri prelevați de la plante.

In vitro, explantele, de dimensiuni mici (de exemplu, la specii de orhidee din genul *Cymbidium* între 0,5—1 mm), care posedă 3—4 primordii foliare, evoluează și produc un fel de bulbi (2—3), numiți protocormi. Aceștia sînt analogi protocormilor pe care îi produc normal embrionii speciilor de orhidee înainte de a evolua în plantule. Tot așa și protocormii dezvoltați din explante *in vitro,* dacă sînt lăsați să evolueze normal, produc plantule în 8—10 săptămîni. Dar protocormul poate fi fracționat sau clonat în 4—8 fragmente sau mai multe, chiar celulare, iar operația se poate repeta la 2—3 generații de protocormi, înainte de a se diferenția primordiile vegetative. Fiecare din aceste fragmente, plasate în cultura *in vitro* sînt capabile să evolueze într-un protocorm-plantulă. Acest tip particular de micropropagare vegetativă sau clonală este utilizat în prezent de numeroși cultivatori de orhidee din lumea întreagă fiind singurul procedeu care permite multiplicarea rapidă pe cale vegetativă a plantelor hibride foarte rare, care prezintă o valoare comercială. Se exploatează astfel proprietatea protocormului de a suporta *in vitro* o perpetuă multiplicare vegetativă. Astfel, la *Cymbidium,* dintr-un singur explant de meristem, prin clonare *in vitro,* în decursul unui an, se pot obține peste 4 milioane de plante identice. După circa 4 ani de la trecerea plantulelor în seră se obțin plante apte de înflorit.

Multiplicarea și propagarea clonală *in vitro* permite înlocuirea sutelor și miilor de m² din seră, încălzite sau răcite, în funcție de sezon, cu cîțiva m² de săli climatizate pentru cultura *in vitro.*

În general, clonarea plantulelor neoformate *in vitro,* nu numai la orhidee, dar și la alte plante ornamentale în minibutași și cultivarea lor pe medii aseptice poate determina obținerea celui mai mare indice de multiplicare a unui individ sau genotip dorit. Acest procedeu are avantajul că explantul donor fiind sănătos, alături de obținerea a mii de plante, copii fidele ale unui exemplar unic, duce la obținerea unor plante în totalitate sănătoase, eradicate de viroze. Prin culturi *in vitro* s-a realizat multiplicarea și micropropagarea industrială la diverse genuri de orhidee *(Cymbidium, Miltonia, Aranda* etc.), garoafă *(Dianthus),* crizantemă *(Chrysanthemum),* ca și la *Gerbera, Freesia, Anthurium,* precum și încercări la *Forsythia, Rosa, Syringa, Magnolia, Prunus* etc.

Asemenea orhideelor și *Gerbera* este o plantă floricolă heterozigotă, cu înmulțire dificilă prin semințe și cu instabilitate ereditară din cauza alogamiei. Din această cauză pentru prezervarea caracteristicilor de soi s-a recurs la propagarea vegetativă prin separarea tufelor adulte, operație destul de greoaie, cu obținerea unui număr mic de plante, adeseori bolnave. Începînd însă din anii 1973—1974 a fost pusă la punct tehnica înmulțirii industriale *in vitro,* prin folosirea unor explante meristematice tulpinale de la un singur individ inițial, valoros din punct de vedere ornamen-

[1] Morel, G. *Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants,* în: „Crop genetic resources for today and tomorrow". Cambridge University Press, 1975.

tal. Vîrfurile vegetative regenerate sau propaguli fără rădăcini se trec pe medii aseptice, pe care dau naștere unor noi colonii posibil a fi clonate. Pentru formarea rădăcinilor, mediul aseptic se structurează corespunzător prin schimbarea balanței substanțelor de creștere după care plantulele pot fi plasate în mediu septic. Înflorirea plantelor are loc după 6—8 luni. Este locul să precizăm că, în Franța, în 1978, din milioanele de gerbere vîndute una din două a fost produsă în eprubetă.

Prin respectarea cerințelor biologice, din explante regenerate și clonate *in vitro*, transplantate în mediul septic din sere, rezultă plante care înfloresc la 7—8 luni la garoafă (dintr-un singur explant meristemal tulpinal de garoafă, cultivat *in vitro*, după circa 60 de zile, se pot obține 40—50 plantule, lipsite de rădăcini, care la rîndul lor pot fi clonate sau repicate în vederea înrădăcinării), la 10—12 luni la crizantemă, la 7 luni la Saintpaulia etc. Aceste plante multiplicate și propagate *in vitro* au avantajul că sînt de o calitate superioară, viguroase, sănătoase și mult mai ieftine. Mai mult, chiar și la *Saintpaulia ionantha*, specie adaptată la înmulțirea prin butași de frunză, aplicarea culturii *in vitro* are avantaje economice și de calitate nete. Astfel (potrivit lui M. Jacob și colaboratorii, 1980), pe mediu septic, prin butășirea clasică, o întreprindere specializată realizează o plantă la prețul de cost de 25 franci belgieni, iar o persoană cu calificare medie, poate obține, într-un an, 80 000 plante, la un preț de cost de 18,09 franci belgieni, în timp ce prin micromultiplicare clonală *in vitro* (prin utilizarea a 5 lucrători) la o producție anuală de circa 400 000 plante prețul de cost se reduce la 14,62 franci belgieni plantă.

La căpșun, metoda clasică de înmulțire se realiza prin recoltarea din plantațiile obișnuite și cîmpuri specializate de înmulțire a stolonilor. De la o plantă mamă se puteau recolta, în condiții optime, 50—100 stoloni. Procesul de înmulțire și testare a plantelor dura 5 ani. În anul 1962, R.O. Belkengren și P.W. Miller, au inițiat microînmulțirea căpșunului *in vitro*. În 1974, Ph. Boxus, prin aplicarea acestei metode, în mediu aseptic, dintr-un singur explant, prin clonare repetată a relevat prosibilitatea obținerii, într-un an, a 100 000 — 150 000 plante, care în anul următor pot fi testate și comer-

cializate. În țara noastră, începînd din 1979, la I.C.P.P. — Mărăcineni — Pitești, din 5 soiuri de perspectivă de căpșun, introduse din străinătate, pentru cîmpurile de elită, plantele inițiale (superelita) se realizează prin microînmulțirea *in vitro*, în condiții controlate, urmată de adaptarea plantelor regenerate în seră sau cîmp. În acest scop, explante tulpinale de 0,1—0,2 mm, cu 1—2 primordii foliare (libere de viruși), pe medii artificiale aspetice, au fost lăsate să prolifereze calus în jurul căruia se diferențiau 20—30 de plantule ușor separabile, moment în care se realiza subcultura, repetată de 2—4 ori. După ultima clonare plantulele sînt repicate pe un mediu *in vitro* favorizator al înrădăcinării și creșterii pantulelor. În final, plantele crescute *in vitro*, sînt transferate în vederea aclimatizării în mediu septic, într-un substrat ușor (de 10—15 cm, alcătuit din 1/3 turbă + 1/3 perlită + 1/3 cenușă de la termocentrale amestecat cu mraniță sau bălegar), la umiditate ridicată (90% umiditate atmosferică, 15—20 zile), cîte 200 plante /m^2. În 1980, I.C.P.P. — Mărăcineni a produs, după această metodă, 120 000 plante superelită pe care le-a livrat în vederea obținerii eliteila 7 stațiuni experimentale. Astfel, în doi ani, din soiuri valoroase, se obține material săditor la scară industrială, liber de viroze și la un preț de cost cu 50% mai redus, comparativ cu metoda clasică (se preconizează ca din microînmulțiri să se asigure cîmpurilor de superelită 300 000 plante, din care, după testările de rigoare, la o rată de 50—100 stoloni/plantă, să se obțină 12 000 000 stoloni, necesari cîmpurilor de înmulțire, în care, la o rată de 25—50 stoloni/plantă, să se producă 300 000 000 stoloni, destinați înființării căpșunăriilor).

În domeniul forestier, cultura *in vitro* a diverse explante permite multiplicarea a numeroase specii. Astfel, în Franța (după M. Boulay, 1980), prin această metodă se multiplică, în prezent, 630 cloni de arbori din 8 genuri și 40 de specii. Se apreciază că la plop, prin cultura *in vitro*, dintr-un singur mugur, într-un an, se pot obține un milion de plante.

Pentru pomii fructiferi care se înmulțesc prin altoire (măr, păr, prun, piersic etc.), din cauza neînrădăcinării butașilor altoi, cultura *in vitro* a explantelor și neoformarea unor plantule normale va simplifica corespunzător producerea materialului săditor din cele mai valoroase soiuri (în timp

mai scurt, cu reducerea mîinii de lucru, uniform genotipic şi liber de viruşi).

La „Primul Simpozion de Culturi Vegetale *In vitro*", organizat în România, între 15—16 decembrie 1981, la Institutul Agronomic din Cluj-Napoca, pe lîngă relevar^^ ^plicării cu succes a culturii *in vitro* în micromultiplicarea industrială a soiurilor de perspectivă la căpşun, s-a arătat că s-a realizat cu succes neoformarea *in vitro* de protocormi şi organogeneza la orhideea *Cymbidium*. S-a menţionat regenerarea la *Saintpaulia ionantha*, din explante de frunze adulte, a unor plantule, care, după 11 — 12 săptămîni de la inoculare au putut fi clonate în propaguli. Aceştia, după alte 12 — 14 săptămîni, au generat noi colonii de plantule, repicabile în mediu septic favorabil înrădăcinării şi care după o lună au fost transplantate în condiţiile de sol obişnuite din seră. Cultura *in vitro* de explante din muguri tulpinali de circa 1 mm, urmată de clonări succesive pe medii adecvate s-a realizat cu succes la *Gerbera* la care s-au obţinut plantule complet conformate, care după transferare pe mediu septic au produs plante mature cu înflorire normală. Metoda folosită poate asigura micromultiplicarea şi micropropagarea acestei specii floricole la scară industrială. La garoafă, explantele meristematice tulpinale de dimensiuni mici (cu două primordii foliare), cultivate *in vitro*, în eprubete, pot asigura multiplicarea soiurilor valoroase. Din aceste explante se obţin neoplantule de 9—10 cm, cu 9 — 11 etaje foliare, ..pă circa 10 săptămîni. Ele sînt utilizate pentru confecţionarea, prin secţionare transversală, a 8 — 10 minibutaşi, de circa 1 cm lungime, cu frunzuliţele aferente nodului şi cîte 1/2 din internodiile învecinate. Implantarea acestor mibinutaşi în eprubete, *in vitro*, asigură creşterea şi realizarea după 7 — 8 săptămîni a unor plantule normale care pot fi trecute pe mediu septic. O tehnică asemănătoare este aplicată cu succes şi la crizantemă.

Cultura *in vitro* de ţesuturi şi celule în vederea multiplicării şi propagării unor soiuri valoroase pe lîngă însemnătatea ştiinţifică deosebită are efecte economice semnificative deoarece unele specii, altădată înmulţite prin sămînţă, au fost convertite la înmulţirea vegetativă, superioară în multe privinţe celei sexuate. Prin polenizare — fecundare cele mai

prolifice plante produc într-un ciclu de cultură de la cîteva zeci de seminţe (grîu, orz, mazăre, fasole) la cîteva sute (porumb, floarea-soarelui, tomate) sau mii (sorg, vinete, sfeclă). La plantele alogame, în lipsa polenizării controlate, aceste seminţe sînt heterogene şi heterozigote, ca urmare, cultura va fi neuniformă. Deosebiri nete prezintă cultura *in vitro* de explante tisulare (şi celulare), dintr-un singur inocul, prin clonări succesive în condiţii aseptice, într-un an se pot obţine zeci şi sute de mii, chiar milioane de plantule utilizabile ca material săditor. Provenind din acelaşi genotip asemenea plante vor fi identice genetic şi uniforme fenotipic. Cultura *in vitro* are şi avantajul că scurtează sensibil (cu 3 — 5 ani) procesul de înmulţire al materialului pentru producţie.

Procesul de creare a unor soiuri noi care durează de la 8 la 15 ani, prin utilizarea metodelor clasice de ameliorare, bazate pe hibridare sexuată urmată de selecţie pedigree sau pe inducerea variaţiilor mugurale urmată de selecţie clonală şi intraclonală poate fi redus drastic pînă la 1—3 ani, prin cultura *in vitro* . Reducerea se datorează ıaptului că micromultiplicarea clonală, pe de o parte, fixează genotipul (eliminarea meiozei inhibă segregarea), iar pe de alta, că prin controlul mediului de cultură se poate realiza o testare mult mai eficientă şi complexă chiar la nivel celular (prin clonare celulară), iar selecţia se aplică pe un număr incomparabil mai mare de indivizi.

Genotipurile unor genitori recunoscuţi ca donori de gene, valoroase pentru ameliorare, ca şi zestrea de gene existentă încă în prezent pe Terra, supravieţuitoare a presiunilor factorilor nocivi, naturali sau artificiali, care nu pot fi stocate şi prezervate prin sămînţă, pot beneficia de „nemurire" prin diviziunea mitotică asigurată de micromultiplicarea *in vitro* (vezi capitolul „Stop! deşertizării pămîntului").

Eradicarea virozelor prin creşterea „in vitro" a meristemelor

Concomitent cu fixarea genotipului, propagarea asexuată, pe lîngă numeroase avantaje, are marele neajuns de a prezerva şi transmite prin mitoză şi diversele incluziuni străine din citoplasmă şi nucleu. Astfel, înmulţirea prin butaşi de

tulpină, frunză, rădăcină sau alte organe vegetative a pomilor fructife i, cartofului, speciilor floricole și forestiere etc. a favorizat transmiterea, directă sau indirectă, și chiar diseminarea a diverși paraziți care se transmit prin organe vegetative. Așa sînt: virușii, molicuții (micoplasmele) și unii fungi din sol, iar dintre dăunători nematozii. Cu precădere virușii, în cazul practicării îndelungate, an de an, a înmulțirii tradiționale prin butași, tuberculi, stoloni etc., debilitează descendenții, producînd o treptată degenerare a soiurilor și culturilor (spre deosebire, înmulțirea sexuată evită virozarea plantelor, deoarece virușii nu pătrund în gameți și, respectiv, în zigoți, ca urmare sămînța este sănătoasă). Bolile degenerative, în special contaminarea virotică a culturilor de cartof, căpșun, garoafă, dalia, trestie de zahăr, banan și altele, datorate transmiterii vegetative sau diseminării prin intermediul insectelor, s-au manifestat alarmant în deceniile 3, 4, 5.

Pentru prevenirea acestor boli au fost imaginate diverse modalități. O mare eficiență terapeutică a avut ideea lui Kunkel (1936) de a distruge virușii prin tratarea termică a plantelor bolnave (la 35 — 39°C, timp de 2 — 5 săptămîni). Spre sfîrșitul deceniului 5, în cercetarea răspîndirii și evoluției diverselor specii de viruși vegetali și a bolilor cauzate au început să fie aplicate, ca și la animale, testările serologice (ulterior și a unor plante indicatori și a electronomicroscopiei). Cu ajutorul acestei metode, experiențele francezilor Limasset și Cornuet, efectuate între 1944 — 1950, au evidențiat stări cu rezonanță practică extremă. Astfel, examinînd serologic, la tutun, sucul extras din frunze, începînd de la apex spre regiunea bazală, aceștia au constatat că în frunzulițele din mugure numărul virușilor este destul de mic ca apoi frecvența virușilor să crească treptat spre zonele mediane și bazale ale plantei. Această constatare i-a îndemnat să analizeze două zone din țesutul apical al mugurelui: calota cu celule meristematice și țesutul adiacent submeristematic. Rezultatul a fost surprinzător: celulele din țesutul submeristematic erau contaminate de viruși, în timp ce celulele meristematice nu cuprindeau viruși. De unde concluzia că celulele meristematice din apexul tulpinii nu sînt încă invadate nici de viruși exogeni în urma atacului unor insecte vectoare și nici cu viruși endogeni în urma multiplicării și migrării acestora din zonele subadiacente infectate virotic. Pe baza acestor experiențe a fost formulată ipoteza că meristemele apicale sînt libere de viruși.

Ipoteza că planta este total virozată, iar meristemele rămîn în general indemne (neinfectate) de viruși a fost demonstrată și experimentată, în 1952, de G. Morel și C. Martin. Lucrarea: *Vindecarea daliei atinsă de o boală virală* relevă intuiția acestor doi cercetători, ca de la plante virozate să preleve meristeme tulpinale apicale, să le cultive *in vitro* și să regenereze plante întregi. Surpriza! Aceste plante erau sănătoase, eliberate de viroze. Explantele din calote meristematice aveau lungimea de 150—200 μm și conțineau 1—2 primordii foliare. Această descoperire a căpătat o recunoaștere internațională începînd cu anul 1955. Ca urmare, cultura *in vitro* de meristeme, în vederea producerii unor plante libere de viruși (de virușii testați), a fost extinsă și la orhidee, garoafe, cartof și, în general, și la alte specii, care, pe diverse medii artificiale, au proprietatea de a regenera plantule normal conformate. Metoda se aplică singură sau combinată cu un tratament termoterapic (termoterapia aplicată sursei de explant trebuie limitată în timp deoarece ea reduce totipotența celulelor și capacitatea de regenerare a plantulelor: la 90% după 10—30 de zile și la mai puțin după 40 zile). Combinarea apare necesară datorită faptului că plantele donor de explante meristematice fiind susceptibile se pot reinfecta cu viruși, precum și împotriva virușilor neidentificați sau mai greu eliminabili. Astfel, plantele de cartof regenerate din țesut meristematic prelevat din apex erau indemne la unii viruși, dar posedau virușii A și Y în proporție de 20—30% și virusul X în proporție de 50%. Cercetări autohtone (D. Cachiță-Cosma și colaboratorii, 1981) au relevat electronomicroscopic că frunzele tinere prelevate de la plantule neoformate *in vitro*, în mediu aseptic (care au rezultat din explante meristematice mugurale de 1 mm cu cîteva primordii foliare prelevate de la plante virozate de *Forsythia suspensa*) erau invadate de viruși, (dispuși în pachete dense în nucleu). Autorii trag concluzia că

în imposibilitatea unor infecții virale secundare virușii depistați proveneau de la planta mamă, prin explantele apicale care nu au cuprins numai meristem ci și țesut submeristematic invadat de viruși.

Succesul obținerii plantelor libere de viroze prin cultura *in vitro*, aseptică, depinde, așadar de mărimea explantului. În general, plantulele regenerate din explante mai mari de 0,75 mm conțin viruși, în timp ce explantele mai mici de 0,5 mm, în special cele de 0,1—0,2 mm, asigură obținerea unor plante libere de viroze.

Plantele de căpșun, *Fragaria ananasa*, înmulțite vegetativ, transmit numeroși factori degenerativi: viruși, molicuți, micoze și nematozi, care reduc producțiile. Numărul agenților patogeni a crescut sensibil ca urmare a introducerii în cultură a unor soiuri productive, dar nerezistente dacă sînt multiplicate vegetativ. În fața acestei situații, tehnicile tradiționale de protejare a plantelor de căpșun, cum sînt chemoterapia, termoterapia și selecția conservativă, nu au dat rezultate satisfăcătoare. Revine lui Belkengren și Miller (1962, citați anterior) meritul de a fi relevat avantajul practic al culturii de meristeme *in vitro* pentru eradicarea virușilor și regenerarea unor plante întregi libere de viroze. În 1963, acești cercetători recomandau excizia și plasarea pe mediul de cultură a unor explante de 2—5 mm din vîrful stolonilor, presupuse libere de viruși chiar în absența termoterapiei. Alte cercetări au condus la concluzia că cea mai potrivită mărime a explantului ar fi o porțiune din vîrful de creștere a stolonului de 0,5 mm care este sănătoasă 100%. Ulterior, Boxus (1974) a ajuns la concluzia că numai explantele mici, de 0,1—0,2 mm (cu maximum 2 primordii foliare) asigură prin cultura *in vitro*, obținerea de plante indemne de viruși, micoplasme, cît și de *Phytophthora fragariae*, *P. cactorum*, *Verticillium* și nematozi. S-a stabilit că la căpșun produc însemnate pagube 54 de tipuri, viruși, 8 specii de molicuți, ș.a., transmisibili prin materialul săditor (obținut prin tehnicile clasice), dar care pot fi eradicate prin cultura de explante meristematicemic iîn mediu aseptic.

La cartof, degenerarea virotică, se poate observa chiar și în anul al doilea de cultură, în cazul în care frecvența

insectelor vectoare de viruși este mare. Astfel, dacă considerăm că un material liber 100% de viroze produce 40 000 kg tuberculi/hectar, la 10% plante virozate producția scade cu 3—4%, la 20% plante virozate producția scade cu 8—9%, la 60% cu 30—40%, la 80% cu 50—56%. Pentru evitarea degenerării virotice și utilizarea unui material săditor liber de viruși într-o proporție cît mai mare, a fost organizat și funcționează un sistem foarte complex, în anumite localități (zone închise), cu zbor redus de afide (vectoare de viruși), ținute permanent sub control chimic, fără alte culturi de cartof, din care sînt eliminate buruienile stimulatoare pentru înmulțirea afidelor etc. Astfel, în România se urmărește ca în județele din sud, materialul săditor să se reînnoiască anual (soiuri timpurii) sau la doi ani (soiuri tîrzii) și să fie din înmulțirea a două (I_2) produsă în zone închise (Rîșnov, Hărman, Ciuc, Suceava etc.) și bazine specializate. În județele din centrul țării și cele nordice, favorabile culturii cartofului, reînnoirea se face la doi, respectiv trei ani, din I_2 și I_3. La suprafața de 293 700 ha (în 1979), cu 55 000 cuiburi la hectar și 60 g în medie tuberculul de sămînță, revine un necesar de aproximativ 1 000 000 t pe an material săditor (22% din producția totală: 4 465 400 t în 1978).

Procesul de producere și înmulțire a cartofului de sămînță durează 8—9 ani. În primii 5 ani se produc înmulțiri clonale, simbolizate A, B, C (în zone foarte înalte, libere de afide), D și E (în zone închise). Tot în zone închise se produc apoi superelita, elita și înmulțirea întîi într-o cantitate de 250 000 —300 000 t (pe circa 15 000 ha), din care se obține I_2 (și I_3) destinată producției.

Aceste condiții deosebit de dificile au impulsionat extinderea în unele țări avansate a metodei culturii de explante meristematice *in vitro*, în condiții de asepsie, în vederea producerii la cartof a materialului săditor liber de viruși. Prelevarea explantelor se face din vîrfurile de creștere ale unor plante infestate din soiurile omologate, tratate termic (la 37°C, temperatură care întîrzie sau inhibă multiplicarea virușilor). Mărimea optimă a explantului prelevat de la

plante virozate este de maximum 0,1 mm cînd neoplantulele sînt, practic, 100% sănătoase, la 0,27 mm procentul plantulelor libere de viruşi este destul de ridicat, în timp ce la 0,6 mm plantulele sînt infectate cu virusul X. În altă experienţă cultivarea *in vitro* a unor explante de 1 mm, prelevate din primordii foliare ale unor plante bolnave, a relevat că din 20 plante analizate, 18 au fost libere de viruşii R, L, Y şi M, însă 6 au fost infectate cu virsul X şi 15 cu virusul S. Este utilă precizarea potrivit căreia în Franţa, în ultimul timp, o staţiune experimentală din Bretagnia, pe baza unei metode perfecţionate, produce şi furnizează anual producătorilor mai multe milioane de tuberculi liberi de viruşi care provin din microplante multiplicate *in vitro*.

Pentru un hectar se folosesc, în medie, 3,5—4 t de tuberculi sortaţi (la 40—70 g), deci la suprafaţa mondială de circa 21 mil. hectare sînt necesare aproximativ 80 mil. t de material săditor. Producerea anuală a acestei cantităţi însemnate de tuberculi, după schema clasică implică eforturi umane şi materiale ca şi suprafaţă de cultură şi spaţii de depozitare de dimensiuni uriaşe, fără certitudinea că în materialul săditor produs frecvenţa viruşilor se află sub limita minimă de degenerarea culturii (sub 5—6% plante virozate). Cele prezentate evidenţiază extraordinara importanţă a producerii materialului săditor indemn de viruşi, prin biotehnologia modernă a culturii explantelor meristematice *in vitro*. Noua tehnologie de producere a materialului săditor, reduce durata cu 5—6 ani, micşorează suprafeţele de sute şi mii de ori (fiind necesare doar săli climatizate pentru cultura aseptică *in vitro*, şi spaţii protejate pentru aclimatizarea plantulelor şi formarea tuberculilor), limitează spaţiile de depozitare etc. Toate acestea sînt atuuri economice exploatate deja cu mult succes, într-o serie de ţări, iar profiturile obţinute impulsionează tendinţa de extindere continuă, în ritm rapid, a acestei biotehnologii la cartof, şi adaptarea ei şi la alte specii cultivate înmulţite vegetativ, susceptibile la agenţi biotici degenerativi.

TOTIPOTENŢA ŞI SELECŢIA UNOR GENOTIPURI SUPERIOARE

Capacitatea exprimată de celulele diverselor ţesuturi vegetale de a regenera plante întregi, totipotenţa, revoluţionează şi metodele de ameliorare a plantelor. În timp ce combinarea şi recombinarea genelor prin modalităţi sexuate se bazau pe întîmplare, cultura *in vitro* ridică spectaculos eficienţa manipulărilor genetice care pot avea ca obiect o celulă, un genom, o genă, un organit sau o funcţie anumită.

Realizare epocală: plante din polen

... sau, păstrînd proporţiile, fără mamă, direct din tată, dintr-un spermatozoid, un copil... dar o asemenea minune încă nu se cunoaşte. Spre deosebire, gameţii femeli sau ovulele (n), fără fecundare, prin partenogeneză (l. gr. *parthenos* — virgin), pot genera indivizi normali. De exemplu, la albine, masculii (trîntorii) se dezvoltă direct din ovule nefecundate. Deci, trîntorii (haploizi, $n = 16$ cromozomi) au numai mamă (matca diploidă, $2n = 32$ cromozomi), nu au tată, ci numai bunic.

Şi acum, o plantă întreagă, prin cultură *in vitro*, direct din polen. (În natură, polenul are rolul să se unească cu un gamet femel pentru a forma zigotul şi embrionul, din care rezultă sămînţa).

Primele plante fără mamă, din celule sexuale mascule, au fost obţinute de cercetătorii indieni S. Guha şi S.C. Maheshwari, în 1964—1966, la specia *Datura innoxia*. Plantele rezultate din polen, format în urma diviziunii meiotice care reduce la jumătate numărul normal de cromozomi al speciei date, vor avea şi ele doar numărul gametic de cromozomi fiind haploide (n). Astfel, în timp ce celulele corporale sau somatice ale *D. innoxia*, fiind diploide, $2n$, aveau 12 perechi de cromozomi, plantele din polen aveau jumătate din acest număr $n = 12$ cromozomi.

In vitro, în funcţie de alcătuirea mediului, cultura de antere de la toate speciile vegetale poate genera sporofiţi

haploizi, fie direct prin dezvoltarea din grăunciorii de polen a unei structuri asemănătoare embrionului, fie indirect prin producerea de calus și regenerarea sporofiților haploizi din celulele calusului. În cultura *in vitro* gametofiții masculi haploizi suferă conversia în sporofiți (după cum în meioză meiocitele suferă conversia din sporofiți diploizi în gametofiți haploizi). Includerea în mediu a unor substanțe de creștere (auxine, ethrel etc.) stimulează diviziunile nucleare mitotice în grăunciorii de polen favorizînd embriogenizarea. Procesele de embriogenizare rezultă în urma conversiei evoluției normale sexuale a nucleului microsporului, cu o evoluție pe cale asexuată, printr-o mitoză activă.

Existența, în celulele plantelor haploide din polen doar a unui singur membru cromozomal din fiecare pereche de cromozomi conferă haploizilor o structură genetică numită *hemizigotă*. Prezența la toți locii din grupele linkage de gene doar a unei singure alele elimină premisele manifestării dominanței și recesivității. Ca urmare, fenotipul haploizilor evidențiază direct, fără nici o opreliște,expresia fiecărei alele particulare prezentă în genotip. Această stare, este defavorizantă pentru fenotip care este firav, mai mic și steril, datorită „depresiunii de haploidizare", dar ajută analiza genetică care, pe baza observației și a diverse testări, poate releva genele marker (care produc efecte detectabile asupra fenotipului) din genotipul haploid, reprezentate atît de alele normale, cît și de alele mutante cu efecte dăunătoare.

Avantaje excepționale pentru ameliorare. *Liniile izogenice.* Cultura *in vitro* a grăunciorilor de polen, într-un mediu în care a fost inclusă colchicină sau alte substanțe antimitotice, într-o concentrație adecvată, determină dublarea numărului de cromozomi. Astfel, dacă grăunciorul de polen a avut 24 de cromozomi (ca la tutun), prin dublare proprie (formarea unui nucleu de restituție) vor rezulta 24 perechi de cromozomi. Caracteristic pentru aceste perechi este identitatea lor perfectă, deoarece ele au provenit în urma dedublării cromozomilor univalenți din nucleul polenului.

Așadar, prin plasarea plenului pe un anumit mediu de cultură *in vitro* și dublarea somatică a cromozomilor hemizigoți, urmată de embrionare, se pot obține plante dublu haploide, cu meioză normală, producătoare de semințe, cu un genotip diploid perfect homozigot. Deci, prin inducerea haploidiei și dublare somatică a cromozomilor, după două generații se obțin plante absolut pure genetic la toți locii, numite linii izogenice. Superioritatea, metodei haploidiei" constă tocmai în aceste două trăsături: obținerea liniilor izogenice și reducerea la două generații a procesului producerii acestora. Spre deosebire, metodele clasice: autopolenizarea (la autogame) și consangvinizarea (la alogame) asigură instalarea homozigoției (relative, nu absolute), după 6—8 generații.

Liniile izogenice diploide, obținute prin metoda haploidiei, se pot utiliza în patru direcții principale:

— în activitatea de ameliorare propriu-zisă. Unele linii, la plantele autogame, care, în procesul de examinare, se remarcă prin caracteristici valoroase, productive, adaptive și de calitate, fiind homozigote (stabile) pot fi folosite, ca atare, în producție. Alte linii complementare în caracteristici valoroase reprezintă genitori excelenți pentru combinarea și recombinarea genelor prin hibridare. Apoi, la combinațiile hibride F_1, pentru fixarea genotipurilor și eliminarea segregării se induce haploidizarea, urmată de dublarea cromozomilor, selecție și testare;

— în producerea comercială a fenomenului heterozis F_1. Liniile izogenice cu capacitate combinativă specifică ridicată, posibil de testat în anul 3, pot fi încrucișate controlat pentru producerea, pe scară industrială, a seminței hibride de primă generație. Tocmai obținerea în masă și numai în 2—3 ani a liniilor dublu haploide perfect homozigote explică interesul foarte mare manifestat de amelioratori pentru metoda haploidiei;

— pentru păstrarea în stoc homozigot a genelor. Prin polenizarea controlată strict (autogamă sau consangvină) genotipul liniilor dublu haploide poate fi prezervat ca atare în cîmpurile de colecție, iar sub formă de culturi *in vitro* de celule în bănci de gene;

— ca material inițial supus acțiunii agenților mutageni, pentru inducerea variabilității genice.

Inducerea mutațiilor în celule cultivate *in vitro*

Mutageneza constă în schimbarea sub acțiunea tratamentelor cu agenți fizici (raze X, ultraviolete etc.) și chimici (baze analoage și substanțe alkylante) a ADN din celulele tratate. Schimbarea indusă a ADN, care este materialul constitutiv al genelor și plasmagenelor, constă în formarea unor noi variante ale acestora sau alele, care se manifestă prin apariția unor caracteristici fenotipice noi. Obișnuit, mutația genică este rară și recesivă, iar locusul în care apare este datorat hazardului. Aceste trăsături ale procesului mutagen, fac ca după metodologia clasică, atunci cînd se tratează plante sau structuri diploide: semințe, inflorescențe și organe vegetative de înmulțire, să fie obligatorie trierea a mii și mii de plante, de pe hectare de cîmpuri experimentale (la un ha 10^4 plante), pînă cînd se detectează o plantă, un mugure sau o ramură mutantă, care prezintă una sau altă caracteristică apreciată ca interesantă. Toate acestea implică cheltuieli însemnate, o perioadă îndelungată de selecție și incertitudinea obținerii unor mutante utile.

Celule libere și agregate celulare nediferențiate (calus) provenite prin mitoză și clonare dintr-o singură celulă — inocul, prelevată, de pildă, de la o plantă haploidă, sau grăunciori de polen cu același genotip, produși de o plantă dublu haploidă, plasate pe un mediu de cultură *in vitro* supus influenței unor agenți mutageni, asigură condiții ideale pentru inducerea și detectarea mutațiilor, pentru că:

— permite cercetarea a milioane de celule aflate în cultură în cîteva cutii-recipient (se poate lucra pînă la 10^8 celule în cultură);

— structura haploidă, hemizigotă a celulelor libere (spre deosebire de plantele întregi sau organele diploide) face ca acestea să se asemuiască microorganismelor unicelulare. Astfel, orice interferare a agenților mutageni cu ADN este prompt inclusă în procesele de replicare — transcripție — translație, evidențiindu-se în fenotipul proteinelor și în comportarea celulei mutante pe mediul concret de cultură *in vitro*. Din celula mutantă mitoza produce linii celulare sau cloni celulari mutanți, iar prin embriogenizare, datorită totipotenței, în condiții adecvate, chiar unor plante întregi.

Induse în ADN-ul unor celule libere normale (de tip sălbatic) aceste mutații afectează funcțiile implicate în realizarea ciclului celular (nu organismal) și a funcțiilor metabolice (biochimice) caracteristice condițiilor culturii *in vitro*. Din cauza similitudinii, pentru indicarea acestor fenomene sînt utilizate noțiuni consacrate pentru microorganisme. Astfel, celula normală (fără mutații recente, de tip sălbatic) este *prototrofă* (are capacitatea să sintetizeze totalitatea substanțelor necesare vieții, deci crește pe un *mediu minimal*), iar celula mutantă este *auxotrofă* (care a pierdut capacitatea de a sintetiza enzime ce catalizează o reacție în producerea unui constituent celular necesar). Din această cauză, mutanta auxotrofă, poate crește doar pe un *mediu complet* (format din mediu minimal plus un amestec complet de metaboliți, mai ales aminoacizi, vitamine etc.).

Includerea în mediu a mutagenilor a indus în celulele haploide ale plantelor superioare cultivate *in vitro* un spectru larg de mutații biochimice și metabolice: auxotrofe, rezistente la diverse substanțe nocive și la boli, adaptabile la temperaturi excesive și la salinitate ridicată a solului, super sau subproductive etc. Primele asemenea mutante au fost detectate de P.S. Carlson (1967), H. Binding și colaboratorii (1970). De atunci au fost selecționate numeroase mutante care afectează un spectru larg de caracteristici ale celulelor cultivate *in vitro*. Detectarea mutantelor este posibilă prin influențarea compoziției mediilor de cultură, așa cum se procedează și la microorganisme.

1) Pentru detectarea mutantelor auxotrofe, celule dintr-o linie celulară, deci cu același genotip, după ce sînt supuse acțiunii unor agenți mutageni, se clonează celular, trecîndu-se pe mediu complet pentru înmulțire. De pe acest mediu fiecare linie se clonează din nou pe mai multe medii selective de creștere, deosebite prin compoziție (mediu complet minus unul sau altul dintre metaboliții strict necesari vieții). Clonele celulare care pe mediu complet cresc normal în timp ce pe unul sau altul dintre mediile de selecție sînt defective relevă o mutație auxotrofă care le face incapabile să sintetizeze baze azotate, aminoacidul, vitamina etc. care lipsesc din mediu. Pe baza unei tehnici asemănătoare Carlson a detectat clone celulare de tutun defective pentru arginină,

prolină, lizină, hipoxantină, biotină etc. Importanța practică? Unele din mutantele auxotrofe, de exemplu, cele lizinodefective, plasate pe mediu suplimentat cu lizină, pot manifesta o capacitate, de ansamblu, sporită de sinteză proteică comparativ cu tipul nemutant.

2) Obișnuit, introducerea în mediul de cultură *in vitro* a unor pesticide: erbicide, fungicide, insecticide, a antibioticelor, deci a unor substanțe utilizate în mod curent pentru distrugerea dăunătorilor culturilor (într-un alt capitol este menționată capacitatea mutagenă a majorității pesticidelor) are efecte nocive, determinînd omorîrea totală a celulelor. În cazul unor concentrații mici, subletale, sau în urma mutagenezei spontane sau induse, unele celule, asemenea microorganismelor, pot manifesta toleranță sau rezistență la acești factori nocivi sau dăunători. Astfel, au fost cultivate celule haploide de *Nicotiana sylvestris* într-un mediu nutritiv lichid în care sursa de auxine a fost asigurată de acid 2,4—diclorfenoxiacetic sau 2,4 — D, folosit ca erbicid împotriva buruienilor dicotiledonate (ca și tutunul). Treptat, cantitatea de 2,4—D din mediu a fost sporită. La fel s-a procedat și la morcov. În ambele cazuri au fost obținute linii celulare și plante (dublate cromozomal) rezistente la doze masive de 2,4—D, fie datorită metabolizării, fie inactivării metabolice a erbicidului. Prin metodologii analoage au fost obținute linii celulare și plante întregi, rezistente la antibiotice (streptomicină, kanamicină), ca și la bazele analoage 8-azoguanina și 5-bromodeoxiuridina, utilizate ca mutageni. Plantele mutante, rezistente la pesticide, prezintă avantaje foarte mari pentru cultură, pentru că ele pot supraviețui unor cantități mari administrate accidental, dar mai ales pentru că unele dintre aceste mutante pot să aibă capacitatea de a metaboliza pesticidele care altfel se cumulează și poluează mediul.

3) Mutația indusă în ADN din celule cultivate *in vitro* prelevate de la soiuri foarte valoroase economic, dar nerezistente la boli, poate afecta și gene care controlează rezistența — susceptibilitatea la diverși agenți patogeni. Pentru detectarea și selecția acestui tip de mutante, cînd patogenitatea este asociată cu o toxină, în mediul de cultură se introduc toxinele, produse de specia sau rasele cele mai virulente

componente ale unei specii patogene date, recoltate din plante aparținînd soiurilor nerezistente. Avînd rol de tester, toxinele vor elimina din mediu celulele normale, nerezistente. Vor supraviețui liniile celulare mutante, care posedă rezistență la bacterii și fungi. Astfel, la tutun au fost izolate celule haploide mutante rezistente la un analog al metioninei, metionin sulfomixina, care este toxina produsă de *Pseudomonas tabaci*. În plus, plantele mutante nu numai că nu se intoxică cu metionin sulfomixina metioninei, dar în extractul din frunze conținutul de metionină este de 5—6 ori mai mare comparativ cu tipul nemutant. S-a menționat că porumbul cu citoplasmă T sterilizantă este susceptibil la noua rasă apărută în *Helminthosporium maydis*. Or, în porumbul îmbolnăvit a fost identificată o toxină care — helminthosporozid .. se fixează pe membranele mitocondriilor din celulele liniilor susceptibile, intoxicîndu-le. Printre celule cu citoplasmă T a fost detectată o linie celulară rezistentă la această toxină. Se speră mult de la acest genotip (nu s-a realizat regenerarea unei plante întregi). În schimb, la trestia de zahăr au fost regenerate plante întregi din celule mutante rezistente la o toxină similară produsă de *H. sacchari*, precum și la virusul care produce mozaic pe plante și la ciuperca *Scleospora sacchari*. După aceeași tehnică, la cartof, din celule haploide mutante, rezistente la mană, *Phytophthora infestans*, au fost obținute plante diploide rezistente.

4) Superproducția de metaboliți, prin creșterea selectivă în conținut a unui component esențial în urma selecției unor mutante rezistente la un analog al acestui component, apare ca un obiectiv important al ameliorării plantelor. Așa cum s-a arătat, linia mutantă de tutun rezistentă la metionin sulfomixină (antimetabolit ca și alți analogi ai aminoacizilor, ai bazelor azotate etc.) producea de 5—6 ori mai multă metionină comparativ cu tipul normal. Tot la tutun, dar și la morcov, s-au obținut linii rezistente la doze mari de 5-metiltriptofan care produceau și acumulau aproape de 30 de ori mai mult triptofan. Alte linii rezistente la parafluoro-fenilalanină acumulau mai multă fenilalanină. La orez, celulele rezistente la analogul lizinei, aminoetil-cisteină, au avut capacitatea de a sintetiza cantități sporite de lizină.

Superproducția unor aminoacizi esențiali are importanță majoră pentru cereale (în special porumb), a căror sămînță conține cantități mici de lizină, triptofan, treonină etc. Din această cauză calitatea proteinelor cerealelor este mult inferioară aceleia a leguminoaselor (care de altfel sînt deficitare în mentionină). Suprasinteza unui aminoacid esențial este posibilă numai în urma dereglării prin mutație a mecanismului principal care controlează constelația și proporțiile aminoacizilor din celulă — plantă. Acest mecanism, are la bază fenomenul de feedback, care constă în inhibarea activității unei enzime de către produșii ei finali. Deci acest fenomen asigură sinteza unui aminoacid oarecare pînă la nivelul determinat ereditar cînd acest produs devine inhibitor al biosintezei; biosinteza reîncepe în cazul reducerii, prin consum, a produsului final, a aminoacidului dat. Analogii aminoacizilor ajunși în celulă accidental, artificial sau prin intermediul unor agenți patogeni, inhibă creșterea celulelor vegetale, deoarece ei acționează ca falși feedback-inhibitori, adică mimează aminoacidul natural, inhibînd una dintre enzimele care intervin în ciclul biosintetic. Mutația în gena care produce enzima ce recepționează nivelul inhibitor al produsului final este singura cale favorizatoare a superproducției unui aminoacid, proteină sau altă substanță utilă. Asemenea mutante pot fi detectate în culturi de celule *in vitro*, iar datorită totipotenței se pot regenera plante întregi, în semințele cărora proteinele pot reflecta schimbarea.

5) Sporirea productivității plantelor este strîns corelată cu o mai bună utilizare a elementelor nutritive din mediu (nitrați, fosfați), precum și cu creșterea adaptabilității sau rezistenței la secetă, ger, la salinitatea excesivă, la minerale și alți factori stresanți din mediu.

Să ne referim la solurile sărăturate, dar și la salinitate, care din păcate se instalează mai devreme sau mai tîrziu în solurile irigate, în funcție de calitatea lucrărilor aplicate. Salinitatea elimină din cultură specii și soiuri utile și scoate din uz suprafețele de teren cele mai fertile. În aceste condiții crearea și cultivarea unor genotipuri tolerante sau rezistente la o concentrație mai mare de săruri solubile în rizosferă apare ca un obiectiv major pentru asigurarea sau prelungirea succesului agriculturii irigate. Metodele tradiționale acționînd

la nivelul plantei întregi nu au eficiență în această direcție a ameliorării. Doar culturile de celule *in vitro* pot depăși impasul datorită unei proprietăți cunoscute potrivit căreia concentrația internă de ioni este reglată de posibilitatea celulei de a limita absorbția ionilor sau excreția ionilor absorbiți. Înseamnă că în populații mari de celule haploide prelevate din soiuri valoroase, supuse acțiunii unor agenți mutageni, cultivate pe medii cu concentrații ridicate de săruri, unele celule cu mutații genice pot să-și regleze viața manifestînd toleranță sau rezistență la salinitate, acest redutabil factor stresant. Astfel, în literatură se citează că la *N. sylvestris* au fost detectate celule care pot viețui normal la 1% sare (NaCl) în mediu, iar la ardei, *Capsicum annuum*, celule care cresc normal la peste 1% sare în mediu, concentrații nocive pentru celulele normale, nemutante. Trecerea culturilor de celule în condiții de temperaturi scăzute sau ridicate poate releva unele genotipuri mutante rezistente, care continuă să crească. De exemplu, la speciile citate, unele celule ținute în mediu de cultură la —30°C, timp de 21 de zile, au continuat să crească.

În prezent, în culturi de celule haploide *in vitro* se realizează cu succes inducerea și detectarea mutațiilor utile. Pentru ca aceste realizări să devină operative este necesar ca celulele să se embriogenizeze, să se dubleze cromozomal și să regenereze plante întregi. Acest proces are loc curent la tutun, morcov și la specii adaptate la înmulțire vegetativă. La plantele agricole cu mare importanță economică (cereale, leguminoase, floarea-soarelui etc.), culturile de celule și țesuturi *in vitro* reușesc, dar regenerarea plantelor întregi impune încă multiple cercetări.

Cultura *in vitro* și hibridarea sexuată interspecifică

Triticale ($2n = 56$ cromozomi) rezultată din combinația *Triticum aestivum* x *Secale cereale* este, practic, singurul genotip-specie cu importanță practică, obținut pe calea hibridării sexuate intergenerice. Numeroase eforturi făcute de cercetători s-au irosit, fie datorită incompatibilității la fecundare sau a țesuturilor hibride, care determinau avortarea

zigoților, neviabilitatea embrionilor etc., fie sterilității plantelor datorită neomologiei și neconjugării cromozomilor în meioză.

Culturile *in vitro* de celule și țesuturi asociate hibridării intergenerice înlătură multe din aceste piedici.

Polenizarea și fecundarea in vitro, între organe reproductive ce aparțin unor specii sau genuri diferite pot învinge incompatibilitatea sexuală, asigurînd obținerea unor hibrizi, altfel imposibil de realizat *in vivo*. Metoda constă în detașarea din florile partenerului matern a unor ovare sau ovule, cu cîteva zile (3—5) înainte de fecundare, trecerea pe mediu nutritiv și plasarea pe acestea a polenului proaspăt, recoltat din florile genitorului mascul. În prezența ovarelor și ovulelor polenul germinează, pătrunde în sacul embrionar în care poate să realizeze fecundarea. Aceasta este probată, după cîteva zile (4—5), de creșterea în volum a ovulelor, în care a avut loc procesul de fecundare, prin segmentarea zigotului, inițierea embriogenezei, formarea endospermului și restului de structuri seminale. Prin plasarea *in vitro* de ovule și polen s-a învins incompatibilitatea la fecundare obținîndu-se zigoți și embrioni din care au generat plante mature. Astfel, s-au realizat hibrizi între speciile genurilor *Melandrium, Nicotiana*, precum și hibrizi între genurile *Melandrium* și *Silene, Nicotiana* și *Hyoscyamus*.

S-a observat că în unele asociații *in vitro* de ovule și polen incompatibilitatea la fecundare poate fi învinsă însă zigoții sau embrionii erau neviabili (la *N. tabacum* și *Petunia hybrida*) sau polenul stimula embriogenizarea oosferelor nefecundate și generarea unor plantule haploide (la *Mimulus luteus* — ovule și *Torenia fournieri*-polen). În multe asociații intergenerice intrafamiliale (*Caryophyllaceae, Solanaceae*) și interfamiliale (*Caryophyllaceae* și *Campanulaceae*) polenizarea *in vitro* a ovulelor nu a învins incompatibilitatea sexuală sau histologică. Rezultatele promițătoare ca și insuccesele înregistrate prin aplicarea polenizării *in vitro* a ovulelor arată că această metodă anulează acțiunea incompatibilității la hibridarea îndepărtată doar în cazul anumitor asociații de specii și genuri și nu este eficace în altele. Probabil cercetările și experimentările vor contribui

la perfecționarea și lărgirea sferei de eficiență a fecundărilor *in vitro*.

Învingerea autoincompatibilității la fecundare. O serie de plante alogame au o polenizare încrucișată strictă, controlată de sisteme genetice foarte eficiente care inhibă germinarea polenului pe stigmatul propriu (sistemul sporofitic de autoincompatibilitate a gameților) sau creșterea tubului polinic în țesutul pistilului (sistemul gametofitic de autoincompatibilitate a gameților). Datorită autoincompatibilității la fecundare la aceste plante nu se pot obține descendenți consangvini homozigoți necesari în cercetările de genetică și ameliorare. Cercetările au evidențiat printre altele, că reacția de incompatibilitate, datorată unor reacții imunologice între proteinele din polen și pistil, apare în trei momente principale: 1. înainte de germinarea polenului pe stigmat (varză, ridiche, secară); 2. în timpul creșterii tubului polinic în stil (*Petunia, Nicotina sanderae*, pomi fructiferi); 3. după ajungerea tuburilor polinice în ovar *(crin)*. Înseamnă că indiferent de sistemul genetic și momentul reacției de incompatibilitate, ovule și polen de la plante autoincompatibile, plasate *in vitro*, vor realiza fecundarea. Astfel, la *Petunia axillaris* și *P. hybrida*, specii autoincompatibile gametofitic, s-a obținut *in vitro* consangvinizarea, prin punerea în contact pe medii de cultură a unor gameți produși de aceeași plantă (ovule + + polen). Fecundarea se petrece după aproximativ 24 de ore. Au rezultat semințe cu embrion viabil, care au generat plante normale, diploide și fertile.

Cultura embrionilor hibrizi valoroși care nu se pot dezvolta normal în țesutul endospermului matern. Moartea embrionilor datorită incompatibilității alostructurilor celulare și țesutului meristematic, ca și influenței nocive a endospermului și învelișului seminal, la unele combinații hibride îndepărtate, poate fi prevenită prin embriocultură, pe un mediu alcătuit din nutrienți exogeni, care să suplinească optim rolul trofic al endospermului. În acest scop, embrioni imaturi (foarte tineri, la cîteva zile după fecundare) sau negerminabili (fără capacitatea de a genera plante) sînt excizați din ovule fecundate sau din semințele celor mai valoroși hibrizi și cultivate pe mediu nutritiv *in vitro* în vederea reluării diviziunilor și

morfogenezei structurilor plantulei. Apoi plantula este repicată în condiții obișnuite de mediu pentru creștere și maturare reproductivă.

Succesele embrioculturii în extinderea reușitelor hibridări intra și intergenerice alcătuiesc deja o lungă listă. Aceste reușite au importanță teoretică, dar și practică, datorită includerii în noile genotipuri, mai ales, a unui spor de adaptabilitate. De exemplu, hibridările *Hordeum sativum* x *H. bulbosum*, *Triticum* sau *Secale* x *H. bulbosum*, *Triticum* x *Agropyron*, *Zea* x *Tripsacum*, *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum*, *Cerasus vulgaris* x *C. tomentosa*, *Gossypium hirsutum* x *G. arboreum*, *Pinus lambertiana* x *P. armandi* etc., în general urmăresc transferul în primul genitor de la al doilea genitor a unor gene de rezistență la viruși, bacterii, fungi, insecte, nematozi. *In vivo*, embrionii din semințele acestor hibrizi sînt neviabili, deci eforturile se pierd, în timp ce embriocultura *in vitro* asigură supraviețuirea embrionilor și generarea unor plante hibride care ajung la maturitate și care pot servi ameliorării. Procesul ameliorării beneficiază însă nu numai de faptul că embriocultura salvează hibrizii îndepărtați, ci și de scurtarea duratei, deoarece *in vitro* se anihilează starea de latență a semințelor, se învinge incapacitatea de germinare sau se scurtează perioada de germinare a semințelor.

Cultura de endosperm in vitro. Nucleul celulelor din endospermul semințelor posedă 3 garnituri haploide de cromozomi -$3n$: două din nucleul secundar al sacului embrionar și una din nucleul celei de a doua spermatii aduse de polen (structura $3n$ este rezultatul celui de al doilea proces de fecundare din sacul embrionar; în primul are loc fecundarea între oosferă -n + o spermatie -n, din care rezultă zigotul — embrionul diploid, $2n$). La speciile diploide, $2x$, cum este porumbul ($2x = 20$), endospermul este triploid, $3x = 30$, în timp ce la grîul hexaploid, $2n = 6x = 42$, nucleul endospermic, incluzînd $6x$ din nucleul de fuziune al sacului embrionar $+3x$ din spermatie, este nonaploid, $9x = 63$ cromozomi.

La vița de vie, $2x = 38$, $3x = 57$, la măr și păr, $2x = 34$, $3x = 51$, la pepenele verde, $2x = 22$, $3x = 33$, la bananierul comestibil, $3x = 33$, unele soiuri de lalea $3x = 36$, zambilă, $3x = 24$, narcisă, $3x = 21$, sfeclă, $2x = 18$, $3x = 27$ ș.a. numeroase soiuri sau specia ca atare la bananierul comestibil sînt triploide (posedînd numărul — endospermic de cromozomi). Starea trihaploidă determină nuclei mai mari și celule mai voluminoase, fapt reflectat în rădăcini, tulpini, frunze, flori, fructe supracrescute comparativ cu organele plantelor diploide. Totodată formele $3x$ pot sintetiza cantități sporite de substanțe utile: zaharuri, vitamine, aromatice. Dar, existența în celulele somatice a 3 garnituri cromozomale face ca la aceste plante meioza să fie anormală, să nu se formeze gameți, ca urmare, plantele rămîn sterile, nu formează sămînță. În schimb, ele produc flori mari persistente și parfumate, fructe uriașe, dulci și fără semințe. Așa sînt bananele, boabele de strugure fără semințe (din care se prepară stafidele), merele (soiurile Gravenstein, Reinette du Canada etc.) și perele (Beurré Diel, Cantillac etc.), pepenii verzi fără semințe, toate cu calități alimentare excepționale.

Aceste precizări au scopul de a releva deosebita importanță practică a culturii *in vitro*, de celule endospermice, generarea plantelor și selecția unor plante cu 3 garnituri haploide ($3n$) în nuclei. Clonarea și regenerarea plantulelor *in vitro* asigură înmulțirea și stabilitatea genetică și agronomică a noilor soiuri trihaploide care beneficiază de fenomenele de poliploidie și heterozis (prin producerea, în unele cazuri, prin hibridare controlată a semințelor donatoare de celule endospermice).

Fixarea structurii genetice și a vigorii la hibrizii F_1. Cultura *in vitro* a celulelor trihaploide endospermice, ca și a unor celule meristematice prelevate din plantule hibride F_1 aparținînd unor hibrizi interliniari comerciali diploizi de porumb, floarea-soarelui, sorg (după asigurarea regenerării plantelor), tomate, vinete, vărzoase, ridiche, castravete, andive, hibrizi heterogametici la asparagus etc., ar determina inhibarea segregării și fixarea heterozisului, la nivelul de manifestare în F_1 pentru multe generații asexuate, fapt care ar elimina necesitatea, foarte complicată și costisitoare, a producerii anuale, pentru toate suprafețele cultivate, a seminței comerciale hibride F_1.

O REVOLUŢIE: HIBRIDAREA PARASEXUALĂ

Fabricarea de specii hibride noi de plante de cultură, superioare celor existente, este un vis al agronomilor. Cîte noutăţi, neînchipuite, de forme şi structuri, de însuşiri utile, ar produce interacţiunea genotipurilor unor plante ce aparţin unor taxoni diferiţi, superspecifici: genuri, familii, ordine clase, încrengături, între procariote şi eucariote, dar între plante şi animale? La *Triticale*, realizare perenă, şi *Papple* (*pear* — pară + *apple* — măr), realizare efemeră, succese ale hibridării sexuate intergenerice s-ar putea adăuga creaţii artificiale incomparabile cu cele naturale tocmai pentru că, drept obiect al unei activităţi planificate de neomodelare genotipică, omul utilizează genitori perfecţionaţi de selecţia naturală şi artificială. Ca urmare, nomenclatorul speciilor cultivate, întocmit către anii 2000, ar putea include *pomata* — tomatocartoful (cartof + tomate), *sunbean* (floarea-soarelui + fasole), o sinteză între floarea-soarelui şi topinambur, porumb şi soia, porumb şi *Euchlena*, grîu şi pir, orez şi sorg, sfeclă şi varză şi multe alte minuni, combinaţii ale creaţiilor naturale şi ale geniului uman.

Protoplastul

...reprezintă o unitate protoplasmatică uninucleată vie, delimitată la exterior de membrana plasmatică (plasmalema). Aşa sînt celulele animale, de exemplu, leucocitele, care iau forma mediului (a capilarelor sanguine), şi care au capacitatea de a include în citoplasmă soluţii cu substanţe macromoleculare sau particule străine prin invaginarea plasmalemei, fenomen numit *pinocitoză*. Două asemenea celule animale în condiţii adecvate pot realiza suprafeţe mari de contact. Acest fapt, prin analogie cu fuziunea, fecundarea celulelor gameţi în procesul sexual a generat ideea posibilităţii inducerii fuzionării celulelor somatice ajunse în contact direct, plasmalemă la plasmalemă. Aşa a fost imaginat procedeul *hibridării somatice* sau *hibridării parasexuale*.

Ultima denumire subliniază faptul că acest procedeu sau metodă asigură hibridarea unor organisme complet deosebite, contra naturii, fără a face apel la procesele sexuale de fecundare naturală.

Cîtă imaginaţie şi cît realism datorăm cunoaşterii biologiei animale? Geneticienii francezi G. Barski şi colaboratorii săi au comunicat, în 1960, că sub efectul unui virus au observat fuzionarea între ele, *in vitro*, a celulelor somatice prelevate de la specii animale, atît de diferite, cum este omul şi şoarecele sau omul şi hamsterul. Celulele hibride om-şoarece, om-hamster au pierdut treptat cromozomii uneia din speciile parentale şi au încetat să se mai multiplice.

Această realizare a produs revoluţie în gîndire şi în tehnicile de manipulare a materialului ereditar. Ea a fost recepţionată cu interes şi pasiune de geneticienii din domeniul vegetal. Considerînd totipotenţa celulelor vegetale ca un colac de salvare pentru metoda hibridării prasexuale, aceştia au sperat că vor putea regenera plante întregi plecînd de la o celulă rezultată din fuziunea somatică. Încercările şi experienţele efectuate nu au dus însă la realizarea acestui vis. Celulele somatice vegetale, inclusiv cele meristematice, puse în contact pe medii de cultură nu fuzionau. În calea fuziunii sta o barieră de netrecut: peretele celular (din celuloză, pectină, chitină; celula animală este lipsită de perete celular). Căutări febrile... memoria cărţilor a adus în actualitate, tocmai din 1880, un nume J. v. Hanstein, şi o noţiune: **protoplast** — o celulă vie fără perete celular. Este starea care favorizează fuziunea celulelor animale; deci, pentru a realiza fuziunea, şi celulele vegetale trebuie aduse la o stare asemănătoare. Însăşi natura oferă exemple: de pildă tubul polinic, în timpul înaintării prin pistil, produce enzime care dizolvă pereţii celulari ai spermatiilor, permiţînd fuziunea gameţilor masculi cu gameţii femeli.

În 1960, cercetătorul E. Cocking, în două pagini, publicate în revista britanică „Nature“, a anunţat că prin folosirea celulazelor, enzime specifice produse de unele ciuperci, a reuşit să digere peretele celular şi să obţină numeroşi protoplaşti de tomate. Pentru menţinerea integrităţii protoplaştilor delimitaţi doar de plasmalemă, ei trebuie păstraţi în medii foarte bogate în zahăr sau în sare pentru a împiedica

presiunea osmotică să-i spargă (difuzia spre interiorul protoplastului încetează cînd concentrația celor două soluții, din protoplast și mediul extracelular, sînt egale). Un deceniu a fost necesar pentru elaborarea tehnicilor de preparare a protoplaștilor, în special din frunze de tutun, dar mai ales pentru obținerea de protoplaști viabili, capabili să regenereze peretele celular și să reintre în diviziune în condiții adecvate de mediu. Diviziunea *in vitro* a protoplaștilor a dat naștere, după cîteva zile, unor colonii celulare, din care după clonare și adăugarea substanțelor de creștere (auxine și citokinine) a proliferat calus. În acesta s-a declanșat diferențierea și formarea de muguri din a căror repicare au rezultat plantule, și apoi, în seră, în mediu septic, plante de tutun normale. Aceste realizări au fost obținute aproape concomitent de două echipe de cercetători (Takebe și col., 1971; Oyama și Nitsch, 1972).

Prepararea și cultura protoplaștilor. Așa cum s-a precizat, primii protoplaști au fost obținuți de Hanstein (1880), care a realizat izolarea mecanică a acestora cu ajutorul plasmolizei și microdisecției. Înlăturarea peretelui celular pectocelulozic prin mijloace fizice traumatiza însă restul celulei. Acest neajuns, împreună cu lipsa unor modalități de menținere în cultură, dar mai ales inexistența unor obiective de utilizare, sînt cauze care au menținut la un nivel scăzut interesul pentru protoplaști. Punerea la punct a metodei culturii celulelor vegetale *in vitro*, descoperirea fenomenului totipotenței și realizarea unor manipulări genetice cu celule animale au fost premise care au determinat cercetările și realizările obținute de Cocking în digestia enzimatică a peretelui celular.

Descoperirile și perfecționările realizate pînă în prezent au permis concretizarea unor tehnici destul de precise și operative în privința preparării și culturii protoplaștilor. Sursele de protoplaști pot fi reprezentate de orice structură vegetală nelignificată. Mai potrivite s-au dovedit însă culturile de celule (fie suspensie, fie calus) în faza de creștere activă (logaritmică) menținute prin subculturi (clonări succesive), mezofilul foliar prelevat din frunze proaspete de la plante tinere, sănătoase și microsporii sau grăuncioarii de polen. (Celulele vîrstnice au pereți celulari groși, dificil sau

greu de degradat.) Ultimele surse, microsporii și polenul, ca și culturile de celule provenite din plantule generate din acestea prezintă un interes major datorită stării lor haploide. Manipularea se face în condiții aseptice.

La degredarea peretelui celular se utilizează enzime celulozolitice și pectinolitice produse industrial (Onozuka: amestec de celulază, macerozimă și pectinază; Driselase: celulază, gluconază și altele). În mediul de digestie, alături de celule și enzime, în vederea păstrării unui pH și nivel osmotic optim, se introduce un stabilizator osmotic (manitol, sorbitol în glucoză, unele săruri anorganice). Concentrația soluției de enzime și timpul necesar digestiei sînt variabile, stabilindu-se în funcție de specie și tipul țesutului utilizat. Incubarea se realizează la 25°C, un timp variabil (de la 10—20 minute la microspori, la 15—18 ore la mezofil). După digestie, mediul se filtrează printr-o sită fină pentru reținerea resturilor foliare, de antere, după care filtratul se trece în eprubete pentru centrifugare în scopul eliminării celulelor sparte sau cu perete celular și obținerii unei populații omogene de protoplaști. Soluția de enzime se îndepărtează prin spălarea protoplaștilor cu soluție de sorbitol sau manitol 13%, care este apoi substituită prin spălare cu soluție de zaharoză 20—25%.

Protoplaștii astfel obținuți sînt celule vii lipsite de perete celular (nude), cu o formă sferică. Ei sînt plasați, obișnuit, în mediu lichid sau pe mediu solid cu agar, cu compoziție similară mediilor folosite în culturile de celule. Aceste medii, diferențiate pe specii pînă la regenerarea de către protoplaști a pereților, trebuie să fie completate cu stabilizatori osmotici (sorbitol, manitol ca și azotat, potasiu, calciu) pentru a menține un echilibru între soluțiile intra și extraprotoplast. În mediu de cultură adecvat, lipsit de enzime degradatoare specifice, protoplaștii inițiază resinteza peretelui celular la suprafața exterioară a membranei plasmatice. Procesul începe la cîteva ore sau cel mai tîrziu la cîteva zeci de ore de la prepararea protoplaștilor și durează pînă la 48 ore.

Celulele provenite din protoplaști în urma sintezei peretelui celular și includerea în mediu a auxinelor se comportă asemenea unor celule meristematice capabile de diviziune. La tutun, după 5—6 zile, aproximativ o treime din aceste

celule încep să se dividă. Se formează astfel colonii celulare, calus, în care, asemenea subculturilor de explante, în prezența auxinelor și citokininelor au loc diferențieri de muguri generatori ai unor plante întregi. Astfel, din culturi de protoplaști, s-a comunicat obținerea de plante întregi la 12—15 specii: tutun, morcov, rapiță, sparanghel, tomate, petunie, obsigă, *Pennisetum*, *Datura innoxia*, ș.a. Calus, fără regenerarea plantelor, a fost obținut din protoplaștii izolați din aproximativ 20 de specii cultivate (soia, mazăre, fasole, in, cartof, orez, trestie de zahăr, porumb, lucernă, castravete etc.). Majoritatea acestor specii sînt dicotiledonate și foarte puține monocotiledonate.

La graminee se întîmplă serioase dificultăți nu atît în obținerea protoplaștilor, de exemplu, din frunze, ci din cauza proprietăților acestora. Astfel protoplaștii au o viabilitate slabă și o redusă capacitate de resinteză a peretelui celular, iar celulele, nou formate din aceștia, relevă o rezistență deosebită la inducerea diviziunii mitotice și nu manifestă proprietatea totipotenței. Trăsături negative se datorează probabil atît unor cauze genetice, cît și unor dereglări structurale sau funcționale provocate de enzime în timpul degradării peretelui celular. La acestea se pot adăuga unele neajunsuri ale mediilor și condițiilor de cultură *in vitro*. Cu toate acestea, constatarea că din celule embriogene rezultate din protoplaști s-au regenerat plante la obsigă (*Bromus inermis*) și *Pennisetum americanum*, ca și menționarea obținerii (la orez și porumb) din protoplaști preparați din organe vegetale, în urma diviziunii mitotice, a unor aglomerări de celule — calus, nu trebuie acceptate ca excepții, ci ca probe ale posibilității, că prin testări de noi tehnici de preparare, medii și condiții de cultură se vor putea induce diviziuni în protoplaștii oricăror specii, inclusiv a gramineelor (și coniferelor).

La ce pot folosi protoplaștii vegetali?

Fiind sisteme unice vii, haploide sau diploide, protoplaștii se pot constitui în obiecte deosebit de potrivite pentru cercetări, studii și experiențe, imposibil sau dificil de realizat cu

celula neprotoplastată. Astfel, se pot realiza studii de biologie celulară și moleculară, urmărind cunoașterea proprietăților membranei plasmatice, a biogenezei peretelui celular și a interrelațiilor morfofuncționale intra și intercelulare. Se pot efectua cercetări asupra desfășurării diferitelor procese metabolice la nivel celular, în vederea stabilirii localizării și distribuției metaboliților, enzimelor, ionilor în protoplasmă (nucleu, organite, vacuole). Cercetările pot fi extinse și asupra efectelor stresante ale unor factori biotici și abiotici din mediu. Protoplaștii oferă posibilități sporite pentru izolarea și cercetarea organitelor celulare (cloroplaste, mitocondrii etc.). Dar o deosebită importanță, adevărată revoluție pentru ingineria genetică, este relevată de proprietățile protoplaștilor: *fuziunea protoplaștilor și comportarea protoplaștilor haploizi asemenea microorganismelor în privința recombinării genetice și mutațiilor.*

Hibridarea somatică prin fuziunea protoplaștilor

Ne amintim: în 1960 s-a observat fuziunea mediată a unor celule somatice animale. În același an, s-au obținut protoplaști vegetali, prin digestia enzimatică, care prezerva totipotența. Exista astfel o realizare de o valoare excepțională și o speranță uriașă: obținerea prin fuziunea protoplaștilor somatici de celule cu capacitatea regenerării unor plante hibride parasexuale supraspecifice. Sînt eliminate astfel ireductibilile piedici (incompatibilitatea) ce acompaniază hibridarea sexuată supraspecifică.

La plantele superioare, după preparare, anterior resintezei peretelui celular, în mediu de cultură, cu o frecvență extrem de mică, au fost observate fuziuni spontane între doi sau cîțiva protoplaști adiacenți cu același genotip. Rezultă o celulă cu doi sau cîțiva nuclei identici: un homocarion multinucleat, care pe de o parte își resintetizează peretele celular, iar pe de alta, suferă fie diviziunea nucleilor, fie fuziunea acestora. Fuziunea spontană a fost observată (în 1966) și la fungul (ciuperca) *Fusarium culmorum*, între protoplaști preparați din mutante auxotrofe sau din diverse tipuri de împerechere. Fuziunea de protoplaști de origine diferită

determină formarea unor heterocarioni în care nucleii parentali sînt separați într-un amestec de citoplasme. Heterocarionii pot să se complementeze nutrițional sau pot da naștere unor nuclei diploizi.

Am făcut mențiunea că protoplaștii vegetali au o formă perfect sferică, ceea ce face ca suprafața lor de contact să fie mică. În plus, spre deosebire de celulele animale, protoplaștii vegetali au tendința de a se respinge reciproc sub influența încărcăturilor electrice negative ale plasmalemei. Aceste două proprietăți împiedică agregarea și fuziunea protoplaștilor. Înseamnă că inducerea fuziunii presupune învingerea acestor piedici, atît prin facilitarea stabilirii unui contact intim între plasmalemele protoplaștilor, cît și prin dezorganizarea parțială a plasmalemei și diminuarea sau modificarea repartizării încărcăturilor electronegative. Numeroase cercetări, efectuate începînd cu anul 1909, au fost încununate de succes abia în 1970, cînd echipa engleză a lui I.B. Power a comunicat fuziunea indusă a protoplaștilor vegetali izolați, bogați în citoplasmă, prin incubarea în azotat de sodiu, $NaNO_3$. T. Eriksson, în 1971, în S.U.A., a indus fuziunea protoplaștilor, foarte vacuolați, prin tratarea cu o soluție ionică similară apei de mare.

Aceste rezultate au pregătit marea realizare a echipei americane P. Carlson, H.H. Smith și R.D. Dearing, care, în 1972, a indus prima hibridare parasexuală interspecifică în genul *Nicotiana*. Aceștia au reușit, prin folosirea $NaNO_3$, să fuzioneze protoplaști ce proveneau din frunze de *N. glauca* ($2x = 24$) și *N. langsdorffii* ($2n = 18$), din care au regenerat plante hibride (asemănătoare cu plantele amfiploide sexuate, cu $24 + 18 = 42$ cromozomi). Cu toate că cele două specii se pot hibrida sexuat normal, realizarea lui Carlson are meritul de a fi demonstrat experimental posibilitatea hibridării parasexuale prin fuziunea protoplaștilor unor celule somatice (ca și hibridul sexuat și hibridul parasexual formează tumori).

Numărul de fuziuni între protoplaștii vegetali din frunze a fost sporit prin folosirea ionilor de Ca^{++} și manitol la pH 10,5 din soluții de $CaCl_2$ (1973). Problema pare însă definitiv rezolvată de canadienii K.N. Kao și M.R. Michayluk, care,

în 1974, au descoperit extraordinara putere fuzionantă asupra protoplaștilor a soluțiilor de polietilenglicol, PEG. Această echipă a obținut celule hibride parasexuale între familii botanice: soia ($2n = 40$; *Leguminosae*) + porumb ($2n = 20$; *Gramineae*) și soia+tutun ($2n = 48$; *Solanaceae*). Fiind atît de diferite sistematic, aceste celule hibride somatice sînt incapabile de a regenera plante și sînt menținute *in vitro* în culturi de suspensii celulare.

Soluția de PEG, la concentrația de 23—30%, cu adăugarea ionilor de calciu, induce agregarea imediată a protoplaștilor. Fuziunea survine în urma ruperii locale a plasmalemelor protoplaștilor adiacenți urmată de sutura plasmalemelor și formarea la nivelul acestora, între protoplaști, a unor punți citoplasmice, care sfîrșesc prin realizarea uniunii, obișnuit între două unități deosebite. Inițial, protoplasmele asociate rămîn separate în spațiu — heterocariocite — apoi, citoplasmele se contopesc (aproximativ după 12 ore), dar nucleii rămîn separați — heterocarion, după care se contopesc și nucleii în unul singur (în interfază — mitoză — syncarioză). Syncarionul include cromozomii aduși de nucleii protoplaștilor genitori: $n + n$; $n + 2n$ sau $2n + 2n$. (Structura care implică fuziunea doar a citoplasmelor în care se găsește un nucleu nefuzionat, adus de unul dintre protoplaști, este denumită *cybrid*). După asociere, heterocariocitul își repară plasmalema, apoi, o dată cu realizarea fuziunii, se produce biosinteza peretelui celular (după circa 24 de ore) și preparativele pentru diviziune — mitotică — a noii celule hibride, parasexuale. Acestea se petrec în mediu de cultură, aseptic *in vitro*.

Descoperirea efectelor PEG, în special, dar și a altor factori fuzionanți și perfecționarea tehnicilor de inducere a fuzionării protoplaștilor a determinat o amplă înmulțire a experiențelor de hibridare parasexuală supraspecifică. Dintre realizări prezintă interes științific aparte *Pomata*, *Arabidobrassica* între *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris* etc. Am văzut că hibrizii între familii de plante: soia + porumb și soia + tutun nu au avut capacitatea regenerării unor plante. La ultimul dintre acești hibrizi somatici, cei doi genomi nu se divid sincron în primele generații celulare. Mai mult, există tendința eliminării cromozomilor tutunului.

Doar în unele celule, după o serie de diviziuni, a fost observată integrarea și multiplicarea sincronă a celor două grupe de cromozomi, timp de cîteva luni. Cînd protoplaștii aparțin aceleiași familii, probabilitatea regenerării plantelor crește. De exemplu, *somatocitul* hibrid (heterocariocitul) *Arabidobrassica*, a generat plante, care, cu toate că amintesc cruciferele, se abat mult de la această familie — prin forma frunzelor și a trichomilor, tipul florilor, a fertilității etc. Plantele au $2n = 65 - 85$ cromozomi. Interesant este faptul că protoplaștii de *B. campestris* preparați din mezofil nu regenerează plante. Înseamnă că în somatocitul hibrid această capacitate a fost complementată de protoplastul de *Arabidopsis*.

Hibrid parasexual (intrafamilia botanică *Solanaceae*) este și *Pomata* provenită din fuziunea protoplaștilor dintr-o linie dihaploidă de cartof și o linie diploidă de tomate ($2n = 24 + 2n = 24$ cromozomi). Acest hibrid somatic, realizat de G. Melchers și echipa sa în 1978, produce plante foarte variabile, asemănătoare cu unul dintre genitori (asimetrie) în privința nucleului și plastidelor, sau plante hibride adevărate (simetrice) care manifestă structurile celulare și caracteristicile ambelor genuri: produc tuberculi și fructe roșii.

Alte fuziuni au fost induse între protoplaști interfamilii botanice: orz și soia, orz și morcov, rapiță și soia etc., intrafamilie: tutun și petunia, mazăre și soia, lucernă și soia etc., intragenerice: între specii de *Nicotiana*, *Brassica* ș.a. Multe dintre acestea, din cauza anomaliilor structurale, funcționale sau incompatibilității genetice, au stopat în faza de heterocariocit sau heterocarion, după un număr de diviziuni sau în cursul proceselor morfogenetice. Unele au generat plante întregi.

Spectaculoase sînt fuziunile induse cu PEG, între celule umane și protoplaști vegetali. Primele experiențe au fost efectuate în 1976 în cîteva laboratoare din lume. Au fost utilizați protoplaști preparați din hibridul parasexual *Nicotiana glauca* + *N. langsdorffii*, care are capacitatea de a genera tumori și celule tumorale umane HeLa (care *in vitro* se divid intens). Dintre celulele puse în contact 2% au

fuzionat, proces observat microscopic și care a constat mai ales în migrarea nucleilor umani în protoplaști vegetali. Heterocarionii au putut iniția cariokineze aparent normale. Au fost induse, de asemenea, fuziuni între protoplaști de tutun și eritrocite de la păsări.

Cele arătate impun reflecția că în faza actuală nu se poate afirma cu certitudine dacă hibridarea parasexuală la plantele de cultură va reprezenta un interes direct pentru agricultură. Este însă o certitudine că fuziunea protoplaștilor va deveni, în perspectivă, o metodă de schimbare radicală a plasmei germinative și de îmbunătățire a genotipurilor. Astfel, fuziunea și dirijarea presiunii selecției pentru anumite caracteristici prin eliminarea uneia din citoplasme cu păstrarea ambilor genomi sau invers prezervarea citoplasmelor și păstrarea unui singur genom, ori, păstrarea totală a structurilor unei specii și parțială a celeilalte, ori substituirea într-o citoplasmă a unor organite, de exemplu, a cloroplastelor, sau dintr-un nucleu a unor cromozomi etc. sînt doar cîteva din intervențiile mijlocite de hibridarea parasexuală, care pot fi realizate relativ facil și în cîteva generații celulare. Astfel, pot fi transferate speciilor cultivate unele caracteristici utile de la forme sălbatice. De exemplu, la tutunul cultivat a fost transferată rezistența la boli ca și androsterilitatea citoplasmică de la tutunul sălbatic etc. Toate aceste manipulări genetice, beneficiind de cultura celulelor *in vitro*, se realizează în timp scurt, reducînd sensibil durata programelor de ameliorare.

Cercetările efectuate au avut ca obiect mai ales inducerea și relevarea comportării hibrizilor parasexuali supraspecifici. Puține studii au fost dedicate hibrizilor parasexuali intraspecifici. Or, trebuie să admitem că primele mari succese tocmai de aici vor veni. De ce? Să nu uităm! În hibridarea sexuată gametul matern, în general, aduce întreaga citoplasmă în care are loc fuziunea nucleului oosferei cu nucleul gametului patern (lipsit de citoplasmă). Deci, citoplasma este tipic maternă, iar nucleul este hibrid. Spre deosebire, fuziunea protoplaștilor este o fuziune totală între două celule cu o combinație unică de citoplasme (și nuclei), pe care natura, datorită evoluției mecanismului reproducerii

sexuate, nu o poate realiza niciodată. Ca urmare, ne putem aştepta ca o celulă somatohibridă intraspecifică, supusă selecţiei, să poată da naştere unei plante care unifică cu succes potenţele funcţionale ale ambilor genitori.

MANIPULĂRI GENETICE ASUPRA CELULELOR VEGETALE

Celulele haploide ale plantelor superioare, protoplastate, aflate în culturi *in vitro*, au multe similarităţi cu microorganismele, în special cu bacteriile. Este adevărat că ciclul vital al celulelor vegetale este de circa 20 de ore, iar al bacteriilor incomparabil mai scurt (în faza de multiplicare exponenţială, în mediu favorabil), de 15—20 minute, dar această diferenţă nu este esenţială. Cu toate că celula vegetală haploidă fără perete celulozic nu poate fi echivalată cu celula bacteriei, ea poate fi asimilată cu aceasta în privinţa celor două categorii de procese care produc variaţii genetice: 1 — transferul şi recombinarea materialului genetic; 2 — mutaţiile genice. Or, tocmai cercetările şi experienţele urmărind inducerea controlată a acestor procese la microorganisme au fundamentat ingineria genetică care a permis extraordinarele manipulări genetice la bacterii. Aceste tehnici pot fi extinse acum şi la plantele superioare prin intermediul protoplaştilor haploizi.

Modalităţile şi tehnicile de inginerie genetică care înseamnă: schimbarea patrimoniului genetic al unor bacterii pentru a le face să sintetizeze şi să secrete o substanţă determinată sînt prezentate în subcapitolul „Mecanismele ingineriei genetice".

Recombinarea ADN la plantele superioare

Explicarea transformării bacteriene, dar mai ales inducerea acestui fenomen la numeroase genuri de bacterii a ridicat problema extinderii procedeului şi la celula eucariotă.

Mulţi ani însă după aceste realizări, în lipsa unor tehnici adecvate, nu s-a putut induce recombinarea genetică prin transformare la organismele eucariote (om, plante etc.). La aceste organisme, procesul de penetrare în celulă şi nucleu a ADNT exogen şi apoi de integrare in cromozomi a segmentelor de ADNT apare ca deosebit de complex şi dificil. Descoperirea destul de recentă că şi la eucariote apare în mod natural un ADN care corectează defectele genetice determinate de mutaţie a permis să se prevadă posibilitatea integrării unui ADN străin în genomul eucariot. Corecţia genetică, care apare numai la organismele superioare, constă fie în integrarea ADN exogen în cromozomi, fie în asocierea acestuia la poziţia cu homologie din cromozom (fără integrare în structura liniară a cromozomului cu defecte genetice. Un asemenea segment de ADN exogen care contribuie la corecţie fără integrare a fost denumit *exozom* de A.S. Fox ş.a., 1971. Aceşti cercetători au studiat un ADN care a indus transformarea la *Drosophila*).

Prepararea şi descoperirea însuşirii protoplaştilor de a fuziona, dar mai ales de a încorpora material genetic străin prin procese similare pinocitozei, a trezit speranţa că, prin analogie cu bacteriile, ar putea fi indusă transformarea plantelor superioare. În celula recipient ADN exogen se poate integra în ADN din cromozomi în timpul replicării şi, apoi, după transcripţie şi translaţie prin sinteza unor proteine specifice în fenotipul recipientului. (Transferul artificial, menţinerea şi expresia unor gene străine — de la bacterii — într-o celulă eucariotă total neînrudită prin intermediul fagilor este indicat prin noţiunea de *transgenoză*, de C.H. Doy ş.a., 1973).

Prima menţiune privind asimilarea ADN exogen bicatenar de către protoplaşti (de soia, morcov etc.), în mediu de cultură *in vitro*, a fost făcută de Ohyama ş.a., în 1972. Între timp au fost anunţate şi alte rezultate care relevă schimbări ale genotipului recipient în direcţia unor donori de gene, dar nu a putut fi demonstrat faptul dacă ADN exogen a penetrat membrana plasmatică şi s-a integrat în genom, pe baza unui proces pinocitozic şi a atracţiei datorată homologiei, sau procesul a fost mediat de un vehicul caracteristic (un fag temperat). Experienţele de transformare prin transfe-

rul ADN de la plante de tip sălbatic în celule sau protoplaşti mutanţi înrudiţi au înregistrat puţine succese concrete datorită, pe de o parte, lipsei unor mutante specifice homologe, iar pe de alta, unor neajunsuri ale tehnicilor de lucru.

Cercetătorul Cocking, care în 1960 a preparat enzimatic primii protoplaşti, a comunicat în 1965 şi 1970 că în protoplaşti poate fi indusă încorporarea de nuclei, cloroplaste, mitocondrii, diferite substanţe, precum şi macromolecule de ADN, viruşi şi bacterii.

O realiza re fascinantă — transplantarea organitelor

Protoplaştii sînt unităţi vii funcţionale din care diversele organite celulare pot fi izolate cu succes, fără pericolul lezării integrităţii acestora. Metoda izolării se bazează pe folosirea unor şocuri osmotice sau liza protoplaştilor, care asigură eliberarea în mediul de izolare a structurilor celulare cu continuitate genetică din interiorul protoplaştilor. Astfel, au fost izolaţi nuclei, mitocondrii, cloroplaste, cu structura intactă şi activitate fotochimică normală. Prin tehnici adecvate aceste organite pot fi transplantate în alţi protoplaşti.

Transplantarea nucleilor. Experienţele de izolare şi transplantare de nuclei au fost iniţiate în 1973 de I. Potrykus şi F. Hoffmann. Nucleii izolaţi, activi funcţional, în număr mare (50 nuclei izolaţi sau mai mulţi / 1 protoplast receptor), erau incubaţi în soluţii şi condiţii de mediu potrivite cu protoplaştii receptori. Prezenţa în mediu a PEG a ridicat frecvenţa includerii nucleilor în protoplaşti (pînă la 3 — 5% din numărul protoplaştilor). Prin tehnici diverse, transplantul de nuclei intra şi interspecific a fost realizat la *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays*. La porumb, în protoplaşti obţinuţi din parenchim, au fost transplantaţi nuclei izolaţi din celule de orz şi grîu. Se poate afirma că o asemenea realizare este de-a dreptul fascinantă. Rămîn însă multe aspecte de cercetat în privinţa evoluţiei nucleului transplantat în sistemul genetic al protoplastului receptor: dacă se integrează într-un nucleu hibrid sau este eliminat, iar dacă se realizează un nucleu de sinteză cît de normală este multiplicarea, cum se exprimă genele în ansamblul noului genotip ş.a.

O tehnică de ultimă oră, care constă în prepararea din protoplaşti, pe cale enzimatică sau prin centrifugare, a subprotoplaştilor: carioplaşti (care conţin nucleu şi o oarecare cantitate de citoplasmă), citoplaşti (protoplaşti enucleaţi) şi miniprotoplaşti (nucleu plus mai puţină citoplasmă decît la carioplaşti), va facilita sensibil transplantul controlat al nucleilor în protoplaşti. Aceste subfracţii celulare pot fi asociate în numeroase alte scopuri de manipulări genetice. Totodată subfracţiile protoplastice pot substitui cu deplin succes backcrossul îndelungat folosit în crearea liniilor analoage citoplasmic mascul sterile. În acest scop, în citoplastul obţinut dintr-un donor de citoplasmă sterilizantă este transplantat un carioplast sau miniprotoplast preparat din linia la care se intenţionează inducerea sterilităţii mascule citoplasmice.

Transferul cloroplastelor şi mitocondriilor. Optimizarea potenţialului fotosintetic şi sporirea eficienţei proceselor de creştere şi respiraţie, obiective prioritare în ameliorarea plantelor, pot fi influenţate şi prin manipularea cloroplastelor (sediul fotosintezei) şi mitocondriilor (sediul fosforilării oxidative). Pentru manipulare aceste organite originare din celule gazdă protoplastate (cu eficienţă fotosintetică ridicată), se izolează şi purifică, prin centrifugare şi enzimatic, apoi se incubează cu protoplaştii receptori (cu eficienţă fotosintetică scăzută) pentru integrare în aceştia (cloroplaştii izolaţi pot fi menţinuţi în culturi *in vitro*). Transplantarea se poate realiza prin pinocitoză şi direct prin microtehnici chirurgicale. Pentru capacitate fotosintetizantă ridicată pot fi examinate şi bacteriile autotrofe şi algele verzi.

Experienţele iniţiale au avut ca obiect transferul unor cloroplaste în celule animale, în care acestea au supravieţuit o oarecare durată de timp, au realizat diviziuni şi au fixat CO_2. Transferul cloroplastelor în celule vegetale a fost realizat de Carlson şi Potrykus (ambii în 1973). Primul dintre aceştia a transferat (prin pinocitoză) în protoplaşti de tutun, preparaţi din mezofilul unei plante „albino" cu mutaţii clorofiliene, cloroplaste normale (verzi). Protoplaştii astfel

manipulați au regenerat plante normale verzi. Ulterior, cloroplaști normali au fost transferați în protoplaști aclorofilieni de morcov și *Petunia*. Pînă în prezent sînt puține referiri privind transplantările mitocondriale la plante. Cunoștințele actuale sînt desprinse din experiențele efectuate asupra culturilor de celule de la mamifere.

„Vehicule" originale pentru transferul genelor

Detectarea expresiei acizilor nucleici exogeni (ADN sau ARN) în celule vegetale cultivate *in vitro* au fost motive foarte serioase pentru cercetarea mecanismelor integrării genelor străine. Iată cîteva observații: într-o suspensie de protoplaști de *Hordeum vulgare*, care au fost incubați într-o soluție de ARN fagic, Carlson (1973) a detectat două enzime fagice specifice, sau incubarea unor celule haploide de tomate și *Arabidopsis* în suspensii de fagi λ și φ 80, transductanți ai operonilor[1] *lac* (pentru sinteza lactozei) și *gal* (pentru sinteza galactozei) de la *Escherichia coli*, i-a permis lui Doy ș.a. (1973) să izoleze linii celulare haploide capabile să utilizeze galactoza. De aici concluzia integrării operonului *gal*$^{+}$ în cromozomii celulelor plantelor. Schimbări similare au fost induse de Johnson ș.a. (1973) prin incubarea unor celule de sicomor, *Acer pseudoplatanus*, în suspensie cu fagul transductant λ.

Analiza acestor rezultate, în special, producerea de către celulele plantelor a galactozidazei bacteriene, a dus la concluzia că operonul *lac* a fost introdus în protoplaști și apoi a fost integrat în unul din cromozomii din cariotipul de morcov, *Petunia* și sicomor de către fagii temperați λ sau φ 80, printr-un mecanism asemănător aceluia care asigură fenomenul de transducție la bacterii (acești fagi la o infecție anterioară au

[1] Operonul este o unitate funcțională reprezentată de un segment din cromozomul bacterian. Posedă mai multe gene învecinate de tipuri diferite: „structurale" care conțin informația genetică pentru sinteza unor proteine sau altor biomolecule (lactoză, galactoză etc.); „operatoare" care declanșează sau nu activitatea primului tip de gene și „reglatoare" care reglează activitatea primelor două tipuri de gene prin intermediul unui semnal chimic numit „represor".

preluat din cromozomul de *E. coli* operonii *lac* și *gal* pe care i-au transdus în cromozomii din unii protoplași vegetali). Studiul comportării celulelor vegetale, eventual și a plantelor regenerate, recipiente ale operonului *gal*$^{+}$, deci cu ADN exogen recombinat, vehiculat de fagi, va contribui atît la lărgirea cunoașterii tranducției la plante, cît și la extinderea experiențelor de transfer controlat a unor gene de la procariote la plantele superioare, și reciproc, dar mai ales de la o specie vegetală la alta, în special, la plantele cultivate.

Bacteriofagii temperați și episomii bacterieni sînt plasmide particulare, autonome în citoplasmă sau integrate în cromozomul bacteriilor. Atît anumiți fagi, cît și anumiți episomi pot prelua întotdeauna aceeași genă sau același material din cromozomul celulei donor. Aceasta permite controlul transferului de gene și implicarea în recombinare a ADN dorit. Clonarea anumitor gene cu ajutorul enzimelor de restricție (care catalizează tăierea la poziții specifice a moleculelor bicatenare de ADN s-au segmentat întîmplător printr-o tăiere hidrodinamică) și transferul acestor gene cu vehicule reprezentate de plasmide (independent de cromozomi și diviziune) conferă ingineriei genetice o eficiență extraordinară și perspective nebănuite pentru ameliorarea plantelor.

Clonarea ADN eucariotic permite analiza diverselor secvențe alcătuite din colecții mari de nucleotizi. Existența unei colecții mari de endonucleaze de restricție, împreună cu metodele rapide pentru determinarea unor secvențe anumite de ADN, crează speranța că vom putea cunoaște secvența de nucleotide a oricărui segment ales din oricare organism. Dar cunoașterea secvenței de baze reprezintă doar un aspect, urmează să fie stabilit faptul cum este interpretată secvența de celulă, cum este codificată și translată într-o secvență de aminoacizi, știut fiind faptul că în celulele eucariote majoritatea ADN nu este codificat pentru proteine. Deci, prin clonare trebuie stabilit care este acest ADN și ce rol îndeplinește în ansamblul celulei. Manipularea diverselor secvențe clonate și reintroducerea lor în celule eucariote va elucida multe dintre aceste aspecte. De aici derivă marea importanță a vehiculelor pentru gene, a plasmidelor (bacteriofagii SV 40 ș.a. și episomi).

Principial, sistemul de clonare a genei constă în clonarea ADN în celula donor urmată de asamblarea *in vitro* a unui segment de ADN (sau a unui grup de segmente) de un vector de ADN (plasmidă sau virus), capabil de replicare într-o celulă potrivită (asocierea este catalizată de enzima ligaza), infectarea organismului gazdă cu ADN hibrid și apoi izolarea clonilor de celule individuale (sau virus), care reprezintă fiecare descendența unei singure celule infectate. Izolarea clonilor este posibilă cînd segmentul de ADN clonat va complementa în celula gazdă o mutantă auxotrofă prin producerea unei proteine enzimatic activă, capabilă să suplinească defecțiunea metabolică a gazdei. Astfel, segmente de ADN din drojdii clonate pe bacteriofagul vector λ sînt capabile de a complementa mutațiile pentru aminoacizii histidină și leucină (*his* B 463 și *leu* — 6) în *E. coli*. Tot așa, orice genă marker din plantele superioare trecută pe o plasmidă și apoi în *E. coli*, în care complementează o mutantă auxotrofă, va putea fi multiplicată și studiată funcțional. La *E. coli*, sușa K—12, au fost construite plasmide hibride între plasmida Colicin E1 sau Col E1 (plasmida coliciongenică. E_1 apare natural în *E. coli* și specifică producerea proteinei antibiotic active, colicin E1) și diverse segmente de ADN din cromozom, fragmentat prin tăieri hidrodinamice, care includ întreaga informație genetică a genomului. Fiecare plasmidă hibridă conține din genomul bacterial sau din genomul eucariotic un segment de ADN cu greutate moleculară aproximativ de 8 la 10×10^6 daltoni. Colecția de plasmide hibride cu ADN genomic permite prezervarea acestuia, fie sub forma unor bănci de colonii de cloni separați transformanți, fiecare conținînd o plasmidă hibridă unică, fie ca asociații covalente de ADN suprarăsucit, izolate din totalul băncilor de colonii. Izolarea plasmidelor hibride Col E_1—ADN (*E. coli*) se realizează pe baza complementării diferitelor mutații auxotrofe de *E. coli*. La fel s-a procedat la drojdii (*S. cerevisiae*) și *Drosophila* (J. Carbon ș.a., 1977).

Existența plasmidelor hibride Col E 1 — ADN genomic în copii celulare multiple crează condiții pentru inducerea transformării controlate a altor celule în direcția donorului, și conduce frecvent la o supraproducție a produselor genelor incluse în aceste plasmide.

Plasmidele care apar natural în *E.coli* (inclusiv Col E1) se replică constant în *E.coli* și în alte bacterii strîns înrudite, dar nu sînt capabile să se înmulțească normal în bacterii gram-negative neînrudite cum sînt speciile importante pentru agricultură: *Rhizobium*, *Agrobacterium* și *Azotobacter*. Deci, pentru îmbunătățirea acestor specii este strict necesară fabricarea unor vehicule potrivite pentru mai multe gazde. De exemplu, din *E.coli*, plasmida RK2 care conferă rezistență la antibioticele ampicilină, kanamicină și tetraciclină, este capabilă să se replice în bacterii gram-negative. Cu ajutorul enzimelor de restricție Eco R I, Hind III și Bam I din plasmida RK2 au fost obținute variante mai mici care posedă gene doar pentru un antibiotic, de exemplu, mini Col E1 — kan transformă *E.coli* senzitivă la kanamicină într-o gazdă rezistentă la kanamicină. Alte derivate din plasmida RK2 și anume PRK229 și PRK248 sînt examinate pentru capacitatea lor de replicare în bacterii gram-negative neînrudite cu *E.coli*.

Pentru plantele de cultură, în urma preparării unor protoplaști cu capacitatea de a regenera plante întregi, tehnicile de clonare a genei și de încorporare a genelor dorite în alte celule, în vederea îmbunătățirii caracteristicilor de creștere sau însușirilor de calitate, prezintă beneficii potențiale enorme. În calea aplicării acestor tehnici stau lipsa unor metode sigure pentru introducerea și integrarea genelor în genomul celulelor vegetale. Este clar că clonarea genelor la plante va fi ușurată mult de dezvoltarea unui vehicul molecular corespunzător pentru inserția ADN exogen în unul din genomii plantei (în ADN cromozomal, mitocondrial sau cloroplastic). În acest scop se poate spera ca virușii, care atacă în mod natural plantele, de exemplu, virușii ADN bicatenari — Caulimovirușii — care produc mozaic la garoafă, conopidă, dalie, căpșuni ș.a. pot fi manipulați, pentru a facilita introducerea și integrarea ADN exogen în celule gazdă. Tot în acest scop ar putea fi utilizate unele formațiuni autoreplicative (plasmide), derivate din ADN mitocondrial sau cloroplastic, fabricate prin tehnici similare acelora folosite pentru producerea derivatelor plasmidei

RK2. Identificarea la drojdii, în celule HeLa, la *Neurospora*, tutun și *Drosophila*, a unor elemente mici circulare de ADN heterodisperse, încurajează producerea, la speciile importante de plante cultivate, a unor molecule mici circulare de ADN, analoage plasmidelor bacteriene, care vor putea fi folosite ca vehicule de clonare.

Între timp, M.R. Davey și J.B. Power (1975) și alții au studiat plasmidele de tip P, normale și oncogenice, din bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, ca și plasmide formate din recombinarea acestora. Ultimele plasmide pot fi transferate cu mare eficiență în orice bacterie gram negativă. În 1979, Davey ș.a. au utilizat plasmide T_i (Tumour inducing plasmid) de la *A. tumefaciens*. După incubarea plasmidelor T_i cu protoplaști de *Petunia* a fost observată transformarea celulelor receptor.

Obișnuit, în celule eucariote plasmidele bacteriene sînt clivate în cîteva segmente și apoi degradate enzimatic. Or, pentru manipulări genetice este necesar ca după penetrarea în protoplaști, plasmidele să fie stabile, să se replice și să încorporeze în genom gena vehiculată.

O tehnică recent încercată constă în încapsularea unor segmente clonate de ADN în formațiuni artificiale de natură lipidică, *lipozomi*. Prin punerea acestora în contact cu protoplaștii este indusă fuziunea. Învelișul lipidic protejează ADN exogen față de dezoxiribonucleaza din mediul de cultură și celular, creînd condiții pentru integrarea segmentului de ADN în genomii gazdei, urmată, eventual, de funcționarea genelor străine.

Recenta utilizare a plasmidelor de la *A. tumefaciens* a permis unei echipe de geneticieni din S.U.A. să realizeze o performanță de răsunet, o premieră originală: transferul de la fasole la floarea-soarelui a unei gene care controlează sinteza unei proteine caracteristice fasolei. Valoarea acestei realizări rezidă nu atît în calitatea proteinei, sintetizată în noul genotip manipulat, ci în perspectivele create ingineriei genetice la plantele cultivate. Descoperirea unui vehicul eficient pentru transportul genelor clonate, deși acesta este susceptibil de îmbunătățiri, trebuie apreciată ca o etapă culminantă în lungul șir de realizări, care au făcut posibilă extinderea tehnicilor de manipulare genetică de la microorganisme la plantele superioare. Se poate spune, fără a exagera, că transferului genetic la plantele de cultură i-au fost deschise larg porțile afirmării.

Acum se deschid perspective însemnate realizării uneia dintre cele mai mari speranțe ale ingineriei genetice agricole: crearea unor cereale și plante tehnice capabile, asemenea plantelor leguminoase, să fixeze azotul liber din aer și să fie cultivate fără administrarea îngrășămintelor azotate de sinteză. Pentru aceasta genele *nif*, fixatoare a N_2, clonate de la *Azotobacter, Klebsiella, Rhizobium* ș.a., legate de vehiculul plasmidial, vor fi incluse în genomul protoplaștilor preparați din plante neleguminoase... Cîte avantaje pentru omenire, ce progres pentru agricultură!

III
EXPERIENȚE NETERMINATE...

REALIZARE MEMORABILĂ: PRIMA GREFĂ GENETICĂ LA UN MAMIFER

1980: pentru prima dată în istoria geneticii un segment de ADN a fost grefat în cromozomii din celulele unui mamifer viu[1]. Obiective? Imediat — perfecționarea tratamentelor anticanceroase, în perspectivă — apărarea organismului de boli ereditare: diabet, anemii, repararea organelor.

Ingenioasele tehnici de microchirurgie care au permis transferul unor gene străine la un organism superior viu, de astă dată un șoarece, au fost puse la punct de echipa de cercetători condusă de dr. M.J. Cline[2], de la Universitatea din Los Angeles.

Să derulăm filmul... Mai întîi, cum se naște o idee remarcabilă dintr-o banală observație: în spitale, substanța anticanceroasă, methotrexatul, devenea din ce în ce mai ineficace pe măsura creșterii dozelor, cu toate că normalul părea

---

[1] Anterior, gene străine au fost transferate, controlat, de la o bacterie la alta, și de la bacterii în celule animale aflate în culturi de celule *in vitro* și reciproc. Astfel, în 1971, gena *gal*+, care metabolizează galactoza în glucoză dintr-o celulă de *E. coli*, a fost transferată, cu ajutorul fagului temperat λ, în celule umane *gal*− prelevate de la un bolnav ereditar de galactozemie. În urma transferului, celulele umane *in vitro* reușeau să transforme galactoza în glucoză; în 1977, dintr-o celulă de șoarece au fost transferate *in vitro* în bacteria *E. coli* genele care controlează sinteza insulinei. Bacteriile descendente moștenesc și transmit aceste gene sintetizatoare de insulină. Faptul că *E. coli* populează intestinul uman a generat speranța terapiei diabetului prin intermediul acestor bacterii manipulate.

[2] Rossion P., F. Harrois-Monin: *La „piece détachée" qui guerit*, în „Science et Vie", Nr. 753, VI, Paris, 1980.

invers. Astfel, celule canceroase sau sănătoase receptau parcă rezistență la această otravă letală și mureau tot mai puține. De aici și lipsa de eficiență a combaterii clasice a cancerului. Pentru elucidarea acestui paradox a fost cercetat mecanismul de acționare al methotrexatului. S-a ajuns la concluzia că această substanță anticanceroasă inhibă sinteza și acțiunea enzimei dihidrofolat reductaza — DHFR, care are rolul de a declanșa în celule procesul sintezei proteinelor. Cînd celula sintetizează DHFR se produce imediat reducerea acidului dihidrofolic în acid tetrahidrofolic, care catalizează sinteza proteică. În prezența methotrexatului DHFR este împiedicată să acționeze, ca urmare, întregul proces al sintezei proteice este blocat, iar în lipsa proteinelor necesare celulele afectate mor. Această idee stă la baza tratării chimice a cancerului. În plus, s-a presupus că celulele canceroase, fiind mai receptive față de methotrexat, vor muri în număr mai mare...

Natura însă se supune doar parțial, experimental, iar cînd methotrexatul este folosit în scopuri terapeutice, celulele ies treptat de sub acțiunea letală a medicamentului dat în doze sporite. Explicația acestui mister a reieșit din cercetările profesorului R.T. Schimke. Acesta a avut ideea de a plasa pe mediu *in vitro* celule embrionare de șoarece împreună cu methotrexat. Ca și în cazul bolnavilor de cancer, unele celule au fost omorîte, iar altele au supraviețuit și s-au divizat normal. Asemenea celule au fost prelevate repetat și trecute succesiv pe mediu de cultură cu doze din ce în ce mai mari de medicament. În final, au fost obținute celule total rezistente la methotrexat.

Celulele rezistente la methotrexat au fost supuse unor ample cercetări. S-a putut astfel constata că ele conțin cantități enorme din enzima DHFR, declanșatoare a sintezei proteice, și, totodată, au capacitatea de a inhiba acțiunea dozelor mari de methotrexat. În plus, în unul dintre cromozomi a fost descoperită gena responsabilă pentru sinteza DHFR. Cum? Analiza comparativă a celulelor martor sensibile la methotrexat și a celulelor rezistente a evidențiat, în acestea din urmă, că un cromozom are un anumit segment-genă, repetat succesiv de cîteva ori, în timp ce, în celulele susceptibile în același cromozom, segmentul respectiv era

reprezentat printr-o singură doză. Deci, cînd gena responsabilă pentru sinteza DHFR este într-o doză simplă, acțiunea ei este blocată de methotrexat, în timp ce duplicarea repetată a acesteia (probabil în urma unor crossing overe inegale succesive) determină sinteza în exces a DHFR și blocarea acțiunii methotrexatului.

Cele două tipuri de celule de șoarece, unul cu gena normală pentru DHFR, și sensibil la methotrexat, altul cu o supergenă (cu gena repetată de 4 ori) pentru DHFR și rezistent la methotrexat, date spre cercetare dr. Cline, au fost centrifugate separat. S-au obținut astfel două tipuri de ADN: unul cu fracția genei normale, altul cu fracția genei gigantice. Apoi, din două rase de șoareci: Ca și T6 (aceasta se deosebea de prima printr-o pereche de cromozomi care era mai lungă) a fost extrasă din femur măduvă osoasă. În vederea incubării, aceasta a fost pusă separat pe un mediu cu calciu: ADN cu gena normală împreună cu celule din măduva de la rasa Ca, iar ADN cu gena gigantică împreună cu celule din măduva de la rasa T6. Calciul din mediu favorizează penetrarea ADN cu genele DHFR în celulele din măduvă. S-a realizat astfel grefa genelor străine în cromozomii din celulele măduvei osoase. Cele două tipuri de celule manipulate (sușa Ca + ADN cu gena normală și sușa T6 + ADN cu gena gigantică) au fost amestecate și apoi injectate în cavitatea peritoneală a unui șoarece din rasa Ca, în prealabil iradiat (iradierea inhibă producerea celulelor sanguine din celule ale măduvei osoase, care rămîn în stare de celule sușe nediferențiate).

Important apare faptul, deocamdată neexplicat, că celulele manipulate injectate în cavitatea peritoneală, după ce au ajuns în circuitul sanguin, s-au oprit în locul lor de origine — măduva osoasă din femur. Acolo, după cîteva zile, ele au început să se dividă și să producă celule sanguine (roșii și albe; celulele proprii din măduva șoarecelui receptor nu mai aveau această proprietate deoarece a fost distrusă de iradiere). În șoarecele căruia i-au fost grefate celule de măduvă astfel manipulate cu gene pentru DHFR, care au început să se multiplice și să producă celule sanguine, au fost injectate ulterior doze din ce în ce mai mari de methotrexat. Acum surpriza cea mare și dovada că grefa supergenei DHFR a reușit: analiza celulelor din măduva osoasă și sanguine a relevat că au supraviețuit injecțiilor cu doze foarte mari de methotrexat doar celulele osoase și sanguine cu cromozomi originari din rasa T6 + ADN cu gena gigant, iar celulele cu cromozomi din rasa Ca, atît cele cu ADN cu gena normală manipulate, cît și cele ale șoarecelui recipient, au fost omorîte de medicament. Aceasta este minunata poveste reală a producerii cu deplin succes a primei grefe a unei gene la un organism animal superior.

Este posibilă reîntinerirea?

Realizarea grefei unei gene și descoperirea genei care conferă o rezistență excepțională la medicamente mortale, și extinderea acestora la om sînt elemente hotărîtoare în activitatea de ridicare a eficacității tratamentului împotriva cancerului. Dovada: imediat după obținerea probei grefei genei gigant DHFR, dr. Cline a considerat posibilă grefarea concomitentă în cromozomii aceleiași celule a două gene: gena de rezistență la methotrexat și gena care produce o hemoglobină normală. Celulele cu o astfel de grefă dublă pot servi la tratarea cu succes a bolnavilor de anemie falciformă, a căror sînge conține hematii în formă de seceră cu hemoglobina anormală[1]. Tratamentul ar consta din injectarea bolnavului, pe de o parte cu methotrexat, în vederea omorîrii celulelor măduvei osoase generatoare de hematii falciforme, iar pe de altă parte, cu celule de măduvă osoasă dublu manipulate (posesoare a supergenei DHFR și a genei s^+, ambele în stare homozigotă), care vor înlocui celulele hemopoietice anormale omorîte. După un astfel de tratament pacientul va produce doar celule cu hemoglobină normală (s^+s^+), rezistente la methotrexat (administrat pentru omorîrea hematiilor anormale, *ss*). La fel poate fi tratată și tala-

[1] Hematiile sau celulele roșii normale ale sîngelui au forma de disc biconcav. În sîngele normal, hematiile sînt lipsite de nucleu și granulații dar conțin hemoglobină care se combină labil cu oxigenul și astfel este transportat la țesuturi. Alela pentru hematii normale este simbolizată s^+, iar alela din hematiile în formă de seceră, din sîngele persoanelor suferinde de anemie falciformă, este simbolizată *s*.

semia (anemie hemolitică), precum și multe din cele aproximativ o sută de boli determinate de mutații genice, printre care și unele forme de diabet.

Am ajuns astfel în ajunul reparării anomaliilor genetice prin substituirea genelor mutante cu gene normale cuprinse în ADN prelevat de la un pacient se cultivă *in vitro* împreună cu ADN posesor al genelor normale în vederea grefării acestuia în locul ADN cu gene anormale, după care se restituie, se autogrefează, prin injectare, pacientului. Autogrefa de celule manipulate poate face posibilă chiar „repararea" unor organe deteriorate: ficat, inimă, rinichi etc., alterate de accidente sau de vîrstă înaintată.

Genetică, histocompatibilitate și trei Premii Nobel

Buletinul fiecărui cetățean, prin înscrisul grupei sanguine, certifică un fapt cu rezonanță majoră: diferențierea serologică între indivizi. Aceasta a fost demonstrată prima dată de K. Landsteiner, în 1900, descoperitorul grupelor sanguine din sistemul AB0. Studiul acestui sistem sanguin a relevat faptul că proprietățile sîngelui sînt controlate genetic de gena I cu trei alele: I^A, I^B și I^O. Alela I^A, respectiv, I^B, dezvoltă în hematii antigenul sau aglutinogenul A, respectiv, B, iar alela I^O nu produce antigeni. Serul sanguin conține întotdeauna anticorpii sau aglutininele (α și β) care corespund antigenilor lipsă din celulele sanguine. Înseamnă că cele 3 alele, cei doi aglutinogeni și cele două aglutinine se pot combina în 4 structuri: A, B, AB și 0. Aceste disimilarități sanguine se reflectă și în transfuzii: grupa 0 este donator universal (pentru 0, A, B și AB), în timp ce A dă doar la A și AB, B la B și AB, iar AB doar la AB. Alte transfuzii sînt nocive producînd hemoliză.

Mulți ani sistemul AB0 a funcționat, practic, fără reproș. Cel de-al doilea război mondial însă, cu mișcările sale masive de populații cu și numeroșii transfuzați, a relevat existența și a altor disimilarități sanguine, care au fost grupate în 14 sisteme, din care 3 principale. Acestea implică peste 60 de gene. Părea că s-a descoperit tot ceea ce trebuia descoperit... pînă în 1952, cînd „șocurile" urmate unor transfuzii san-

guine, corecte și controlate, a readus problema histocompatibilității în programele de cercetare.

Rezultatele prețioase ale acestor cercetări au încununat cu laurii Premiului Nobel, în 1980, pentru medicină (în regulament nu este prevăzută biologia) pe profesorul american G. Snell (pentru evidențierea existenței unui sistem major de histocompatibilitate la șoarece), profesorul francez J. Dausset (pentru evidențierea aceluiași sistem la om) și profesorul american B. Benacerraf (pentru demonstrarea mecanismelor).

La șoarece, sesizarea existenței unei amprente care dă specificitate nu numai celulelor sanguine ci și restului celulelor i se datorează cercetătorului englez P. Gorer. El consideră că acest fel de comportare se datorează unui antigen a cărui specificitate este comandată de un grup de gene situate în unul dintre cromozomi, într-o regiune precisă numită H2. Acest antigen este responsabil pentru acceptarea sau respingerea unei grefe, cu alte cuvinte controlează compatibilitatea, respectiv, incompatibilitatea, dintre țesuturi. De unde denumirea de sistem major de histocompatibilitate.

Pentru cercetarea structurii și funcționării genelor H2, G. Snell, în urma unor eforturi susținute și prelungite, creează o rasă originală, șoarecii congenici (linii izogenice), în care marea majoritate a genelor sînt identice, minus genele care guvernează histocompatibilitatea (H2). Astfel, a fost creată o colecție de linii de șoareci care posedau diferite gene H2, dar care erau perfect identici în privința restului genelor din genotip. Șoarecii congenici sînt indispensabili pentru orice studii asupra aspectelor genetice a histocompatibilității, precum și în cercetările de imunologie și imunogenetică.

Avantajul folosirii acestor șoareci este enorm, deoarece orice reacție fiziologică, care se deosebește de la o linie congenică la alta, poate fi atribuită, în totalitate, genelor histocompatibilității, singurele care diferă la indivizii congenici. Folosirea șoarecilor congenici ca donori și receptori de țesuturi a arătat unele legități ale histotransplantării: grefele sînt compatibile cînd se realizează între doi indivizi identici

în privința genelor H2; grefele sînt incompatibile cînd indivizii implicați sînt diferiți în privința genelor H2.

Eșecul unor transfuzii sanguine corecte în cadrul sistemului AB0 și rhesus, remarcate de J. Dausset, l-a determinat să considere că trebuie să existe un alt sistem de compatibilitate care nu implică numai globulele roșii. Confirmarea i-a fost dată de studiul serului obținut din sîngele oamenilor primitori, care au suportat greu transfuzia: acest ser aglutina globulele albe din sîngele donorului. Deci, și globulele albe posedă antigeni specifici, care în cazul transfuziilor pot provoca reacții de apărare și chiar de respingere. De aici ideea genială, care va juca un rol capital în tehnica grefării, că nu există un singur „marcaj" sanguin al fiecărui individ, ci un „marcaj" tisular, prin care fiecare celulă recunoaște ca străine toate celulele care provin din alt organism. Acest marcaj este determinat genetic de către un sistem complex numit inițial Hu 1 și apoi HLA („Human Leucocyte Antigen").

Analiza genetică a evidențiat că genele HLA sînt situate în cromozomul 6 din cariotipul uman ($2n = 46$ cromozomi). Genele HLA au fost descoperite pe baza antigenilor produși care sînt molecule proteice specifice codificate selectiv de fiecare genă în parte. Structura acestora a relevat că în regiunea HLA sînt incluși 4 loci — gene simbolizate A, B, C, D. La fiecare din acești loci există numeroase alele (serie de alele), care în parte controlează sinteza altui antigen. Astfel, pînă în 1975, au fost detectate la locusul A 18 alele — antigeni, la B 22 alele, la C 5 alele, iar la D 6 alele. Posibilitatea de combinare între ele a acestor alele este uriașă — peste 40 miliarde, de aproape 10 ori mai mare decît populația umană actuală. Înseamnă că probabilitatea ca doi indivizi să aibă aceeași structură HLA este infimă. Iată cauzele extremei diversități și specificitatea fiecărui individ. Aceasta explică pluralitatea reacțiilor oamenilor față de boli și inegalitatea lor în fața agenților nocivi.

Aceste descoperiri au aplicații multiple. Astfel, ele arată că pentru grefa de organe sînt potrivite doar cuplurile donor-

receptor ale căror sisteme HLA sînt pe cît posibil mai apropiate. (Mai potriviți sînt gemenii monozigotici). Important este și faptul că analiza comportării a peste 500 de grefe de piele practicate asupra unor voluntari, din inițiativa prof. Dausset, a permis punerea la punct a unei baterii de teste care sînt folosite rutinal în „bilanțul preparator" al tuturor operațiilor de transplantare. La fel de importante sînt și corelațiile descoperite între diverse maladii și unele grupe tisulare, respectiv, unele combinații din sistemul HLA. De exemplu, 98% dintre subiecții suferinzi de spondilartrită anchilozantă (reumatism cronic deformant al coloanei vertebrale) au antigenul B 27, iar miastenia (slăbiciune — pseudoparalizie musculară) este frecvent asociată cu prezența antigenului B 8, psoriazisul cu antigenul CW6, boala lui Addison cu antigenul DW3 ș.a. Numeroasele cercetări în curs asupra sistemului și combinațiilor HLA au permis să se prevadă posibilitatea determinării unor predispoziții față de boli și, în consecință, să fie organizată o prevenire specifică și eficace a apariției acestora.

Răspunsul imunitar al organismului a fost cercetat de profesorul Benacerraf. În acest scop a supus analizelor șoareci injectați cu antigeni chimici bine definiți. Rezultatul? Ca răspuns, șoarecii au produs anticorpi care variau în funcție de indivizi, iar aceste variații erau determinate de o serie de gene ce aparțineau sistemului de histocompatibilitate (*He*). Regiunea unde se găsesc aceste gene, în unul dintre cromozomii șoarecelui, a fost simbolizată *I*, iar grupul de gene care codifică răspunsul imun *Ir* („Immune response"). Tot în această regiune se găsesc și genele *Ia* responsabile pentru producerea, la suprafața tuturor celulelor unui organism a substanțelor specifice — antigenii, care controlează normalitatea celulelor și comandă la nevoie respingerea. Proasta funcționare a acestui mecanism de control poate fi cauza ecloziunii și proliferării celulelor anormale. Acestei presupuneri, ca și genelor *Ia*, li se acordă un interes excepțional deoarece cancerologii consideră că ele pot da răspuns cauzelor, prevenirii și terapiei malignizării.

Grefa genetică: modalitatea cea mai promițătoare în tratarea bolilor

Am văzut că îndată după reușita grefării la șoarece a genei gigant DHFR, care asigură recipientului protecție totală față de methotrexat, dr. Cline, specialist în tulburări sanguine, a întrevăzut posibilitatea aplicării unei tehnici similare la om, în scopul tratării unor boli genetice. Într-adevăr, la puțin timp după prima realizare, el a efectuat intervenții genetice asupra a două femei care sufereau de talasemie (formă de anemie hemolitică datorată persistenței hemoglobinei fetale — hemoglobina F; poate antrena moartea prin infecție sau prin insuficiență cardiacă). Acestor paciente le-a fost grefată gena pentru hematii și hemoglobină normală, restul genotipului rămînînd intact.

Hibridomul va revoluționa terapeutica?

Hibridomul — două celule diferite fuzionate (hibridate) în laborator: prima, care fabrică un anticorp (substanță capabilă să protejeze organismul contra unei infecții specifice), a doua, care conferă primei celule o capacitate mitotică nelimitată. În mediu de cultură, hibridomul se multiplică activ și fabrică un anticorp, ceea ce i-a atras denumirea de „uzină celulară". Noua realizare a înaripat imaginația imunologilor.

Aceștia întrevăd posibilitatea ca celulele hibride produse controlat, eventual anterior manipulate, să fabrice, în cantități mari, la prețuri mici, toate felurile de anticorpi umani. Astfel, va avea loc revoluționarea terapeuticii prin transformarea radicală a metodelor de tratare a numeroase boli și prin deschiderea a noi perspective fabricării serurilor și vaccinurilor.

„Fabricarea" primilor hibridomi (lat. pl. „hibridoma")[1] cu însușirile menționate a fost realizată la șoarece, în Marea

[1] Dorozynski A., *L'hybridome, machine à fabriquer des anticorps*, în „Science et Vie", Nr. 757, X, Paris, 1980.

Britanie, în 1975, de C. Milstein și G. Köhler. În cursul unor cercetări fundamentale în imunologie aceștia au fuzionat celule originare din splina unui șoarece (celulele splenice produc anticorpi) cu celule de plasmocitom (cancer propriu șoarecelui, unilocalizat, cu caracter benign). Surpriză mare a produs constatarea că unele linii celulare hibride produc un anticorp specific, capabil de a reacționa cu un antigen precis (substanță străină) și a se multiplica perpetuu (spre deosebire, celulele normale, după cîteva diviziuni, încetează diviziunea).

Probabil că Milstein și Köhler n-au sesizat însemnătatea, teoretică și comercială, a originalei lor descoperiri. Spre deosebire de geneticștii americani H. Boyer și S. Cohen, inventatorii ingineriei genetice, care au realizat, în 1972, primele „manipulări genetice" (asupra plasmidelor R din bacterii) și au depus o cerere de brevetare, inventatorii hibridomilor nu numai că nu au încercat să breveteze invenția lor, ci, îndată după publicarea rezultatelor, au răspuns prompt numeroaselor cereri trimițînd către diverse laboratoare noul „manip" (organism manipulat genetic).

Este necesară sublinierea că anticorpul produs de un hibridom prezintă multe avantaje: 1) este pur, deoarece este produs de celule identice provenite prin clonare dintr-o singură celulă inițială (spre deosebire, un organism, în care a fost introdus un antigen, produce un amestec de anticorpi); 2) se produce o cantitate mare într-un timp scurt și la un preț redus; 3) hibridomul poate fabrica, drept răspuns la antigeni, orice anticorp. Tocmai avantajele menționate, dublate de perspectivele comerciale, au atras atenția marilor laboratoare farmaceutice, care s-au lansat în cercetarea aplicațiilor fuziunii unor celule diferite, una normală, alta canceroasă. Astfel, în anul 1980, cinci societăți particulare au investit circa 25 000 000 dolari în cercetarea hibridomilor.

Au fost efectuate multe încercări pînă cînd cercetătorii H.S. Kaplan și L. Olsson, în S.U.A., au creat primul hibridom uman. Pentru aceasta ei au indus fuziunea unei celule prelevată din splina extrasă (ablaționată) de la un pacient atins de maladia Hodgkin (boala ganglionilor limfatici) producătoare de anticorpi, cu o celulă canceroasă ce provenea dintr-un mielom (tumoare a măduvei osoase) cu diviziune stabilă în cultură. Acești hibridomi contra prezenței în mediu

a substanței antigenice 2-dinitroclorobenzen (DNCB; injectată bolnavilor cu ocazia testărilor imunologice care preced ablația splinei) produc constant un anticorp specific. Anticorpul produs nu are nici o utilitate pe plan medical, dar el demonstrează posibilitatea (teoretică) a hibridomilor umani de a fabrica toate felurile de anticorpi: este suficientă „vaccinarea" celulei hibridom cu fel de fel de antigeni pentru a obține fel de fel de anticorpi.

Realizarea hibridomilor umani, anunțată la Congresul al IV-lea de imunologie, ținut la Paris, în 1980, a fost apreciată ca fiind considerabilă, cu toate că, în prezent, este încă în faza de promisiune. Speranța este întărită de faptul că un hibridom de șoarece a produs un anticorp, care atacă parazitul ce transmite paludismul la șoarece. Injectarea șoarecilor sănătoși cu acest anticorp îi protejează împotriva infecției paludeene. Prin analogie, se consideră că printre hibridomii umani este posibilă detectarea unora care fabrică un anticorp specific împotriva hematozoarului palustru (*Plasmodium*), ce ar putea fi folosit ca vaccin pentru prevenirea malariei, care, în prezent, afectează cîteva sute de milioane de oameni. Tratarea cancerelor umane este o altă promisiune a hibridomilor. Aceasta are la bază experiențe la șoareci, care au relevat că anticorpii puri atacă unele celule leucemice, protejînd indivizii bolnavi. De unde ideea identificării prealabile a ansamblului de anticorpi susceptibili și a dozelor necesare să se opună uneia sau alteia dintre formele de cancer uman.

Într-o fază exploratorie se găsesc cercetările menite să acroșeze (agațe) anticorpii de medicamente în vederea unei mai bune trimiteri spre o anumită țintă (organ) a acestora. Faptul că orice anticorp are o destinație specifică face ca amestecul medicament + anticorp să fie „teleghidat" spre anumite țesuturi sau celule. Teleghidajul a fost demonstrat de echipa doctorului E. Haber (S.U.A.) care, plecînd de la specificitatea anticorpilor pentru miozină (din țesutul muscular al inimii), a pus la punct o metodă destinată constatării daunelor cauzate de infarctul coronarian. Acești cercetători prevăd că anticorpii puri ar putea fi utilizați pentru neutralizarea virușilor, împotriva cărora nu există medicamente cu eficacitate comparabilă cu aceea a antibioticelor împotriva

bacteriilor. De exemplu, este posibilă fabricarea și folosirea unor asemenea anticorpi împotriva virusului care produce hepatita B. Hibridomii pot fabrica, de asemenea, anticorpi specifici, meniți a substitui gammaglobulinele de origine umană, care sînt foarte scumpe. Acești anticorpi pot proteja persoanele nevaccinate împotriva tuturor tipurilor de infecții. Anticorpii produși de hibridomi pot fi utilizați în sute de teste și probe de laborator bazate pe reacții imunologice. De exemplu, cu ajutorul testelor radioimunologice poate fi relevată în organism o substanță prezentă în cantități infinitezimale (10^{-15}g), deoarece contra ei se produce un anticorp specific.

Iată principalele potențialități oferite de hibridomi; pe cînd în actualitate?

Virușii sub control?

Subliniem: la suprafața tuturor celulelor unui organism uman (în afară de hematii, celule fără nucleu) există structuri particulare — molecule proteice, identice pentru ansamblul de celule ale unui individ, dar variabile de la un individ la altul. Molecule proteice, la fel de specifice pentru o persoană ca și amprentele sale digitale, sînt antigenii sistemului HLA (puși în evidență pentru prima dată pe suprafața leucocitelor). Acești antigeni, numiți de histocompatibilitate, determină priza sau respingerea unei grefe. Grație cunoașterii sistemului HLA este posibil, astăzi, de a împerechea donorul și receptorul care posedă antigeni HLA foarte apropiați, chiar identici (caz posibil doar în cazul gemenilor monozigotici). Trebuie menționat și faptul că genele care codifică sistemul HLA reglează, de asemenea, și interacțiunile dintre limfocitele T, limfocitele B și macrofage, determinînd amplificarea sau deprimarea răspunsului imunitar (în sistemele imunitare umorale și celulare).

Aceste descoperiri au implicații practice importante, deoarece s-a constatat corespondențe între unele particularități ale sistemului HLA și unele boli (menționate anterior). Prima demonstrație a fost făcută la șoarece, la care o formulă antigenică H2 (echivalentul HLA uman) părea că predispune individul purtător la leucemie provocată de un virus.

La om însă, în ciuda a numeroase cercetări, nu a fost constatată nici o relație între sistemul HLA, pe de o parte, și leucemii și alte forme de cancer, pe de altă parte. În schimb, au putut fi puse în evidență asociații foarte strînse între unii antigeni HLA și multe boli, în mare parte provocate de cauze necunoscute, și, ca urmare, clasate printre maladiile autoimune (leziuni produse de imunitatea specifică a autoanticorpilor față de proprii constituenți ai organismului, deveniți autoantigene). Aceste boli au deseori caracter familial, cu evoluție cronică sau subacută (frecvent asociate de prezența anticorpilor autoimuni dirijați împotriva autoantigenilor).

Despre viruși și apărarea imunologică: majoritatea oamenilor cunosc că pojarul sau rujeola, cauzată de un virus, conferă organismului o imunitate definitivă față de acest agresor. Deci, rujeola este o boală imunizantă: anticorpii antirujeolă, formați la prima agresiune, rămîn în circulația sanguină și protejează organismul toată viața. În acest caz, îndată ce pătrunde în organism, virusul este recunoscut de globulele albe situate în prima linie a apărării imunologice. Capsida sau învelișul proteic al ADN viral care produce rujeola nu poartă antigeni care să corespundă antigenilor HLA. Ca urmare, globulele albe declanșează reacția de respingere-anticorpii, care asigură imunitatea individului.

Alți viruși nu produc — apărare imunologică, de exemplu, herpes — virus tip 1. Acest virus posedă un antigen care este identic cu un antigen prezent în unii oameni. Cu alte cuvinte, unul din cifrurile învelișului particulei virale este comun cu unul din cifrurile din celulele individului atacat. Din această cauză producerea masivă de anticorpi pentru respingerea unui astfel de agresor duce la atacarea antigenului comun și la distrugerea țesuturilor proprii de către propriul sistem de apărare. Evoluția a asigurat totuși și în acest caz un sistem imunitar care constă în sinteza unor anticorpi particulari — imunoglobulinele de tip E sau IgE (din punct de vedere imunochimic imunoglobulinele se împart în 5 clase: IgA, IgD, IgE, IgG și IgM). În cazul contactului cu antigenul care a stimulat sinteza sa IgE provoacă formarea unui „lac" de plasmă extravasculară, vezicula herpetică (provenită din dilatarea vaselor sanguine și plină cu lichid plasmatic), care reprezintă tocmai rezultatul imunologic (leziunile cutanate produse în urma atacului virusului herpetic sînt recidivante, și pot fi deosebit de grave dacă ating corneea care se poate opaciza. Se impun astfel măsuri chirurgicale și grefe, dar grefonul, la rîndul lui, se poate opaciza în cazul recidivei. Acestea relevă gravitatea virozelor herpetice). Anticorpii IgE circulă puțin și sînt inactivați în cîteva săptămîni. Ca urmare ei nu sînt apți să confere o imunitate solidă. Deci, răspunsul imunologic al omului vaccinat sau infectat cu herpes-virus tip 1 este ambiguu. (Sinteza IgE poate fi identificată și în alte situații, de exemplu, în cazul unor boli tropicale, al atacului unor acarieni, al unor medicamente provocatoare de alergii etc. Prezența IgE relevă existența unui antigen comun la gazdă și invadator. Spre deosebire de IgE care tolerează sau elimină selectiv intrusul suspect cu antigeni comuni, imunoglobulinele G și M distrug fără menajament antigenul lor — ținta, provocînd autodistrugerea. Așa se întîmplă în cazul anemiei hemolitice, cînd organismul prin autoanticorpii sintetizați distruge propriile globule roșii).

Un vaccin eficace împotriva herpes-virus 1. Acest virus a fost supus unor ample cercetări de către francezii R. Roudier și Demillière. Ei au reușit să obțină un vaccin, din virus herpetic inactivat, care, probabil, din cauza antigenilor comuni s-a dovedit neeficace și a fost retras din comerț. Pentru depășirea impasului, ei au căutat un microorganism cu antigeni comuni cu virusul herpetic, dar care nu avea antigeni comuni cu celula umană și care poate fi atacat de IgG și IgM. Un candidat potrivit s-a dovedit a fi agentul pneumoniei, bacteria *Pneumococcus*, sușa Aurelia, care nu posedă nici un antigen de-al omului, dar posedă numeroși antigeni comuni cu herpes-virus 1. Prin inactivare (omorîre) cu formol a pneumococilor s-a obținut un vaccin, care în urma injectării (2 miliarde de germeni pe mililitru), antrenează dispariția rapidă a leziunilor corneene, prin introducerea unor anticorpi care distrug virusul herpesului (succesul tratamentului este posibil cînd leziunile corneene sau keratitele acute nu sînt definitive).

Antigenii din pilii bacterieni și polivaccinurile. Obișnuit, vaccinurile bacteriene se prepară din extracte celulare sau din bacterii inactivate (omorîte termic sau chimic, prin căl-

dură sau formol, dar cu păstrarea intactă a structurii antigenice. Vaccinul poate conține un singur antigen — monovaccin sau cîțiva antigeni — polivaccin).

Pilii (observabili electronomicroscopic) sînt formațiuni filamentoase la suprafața bacteriilor, care asigură fixarea de țesuturile victimei sau intervin în transferul materialului genetic (pilii F, prezenți la bacteriile F^+ cu funcții mascule). S-a constatat că sușele care posedă pili sînt mai infecțioase, comparativ cu cele nude. Pilii posedă antigene. Primul vaccin „piliar" a fost produs în scopuri veterinare pentru combaterea diareei de origine bacteriană, uneori mortală, la taurine și porcine. După ani de cercetări s-a pus problema fabricării unui vaccin contra blenoragiei, boală deosebit de gravă la om, produsă de gonococul *Micrococcus gonorrhoeae*, mai ales după ce unele sușe au devenit rezistente la penicilină. În speranța că organismul uman va produce anticorpi contra pililor, în S.U.A. a fost preparat un vaccin antiblenoragic din pili de gonococ. Creatorul, prof. C. Brinton, de la Universitatea din Pittsburgh, a folosit voluntari (în caz de infecție ușor vindecabili cu ajutorul penicilinei), cărora li s-a introdus în uretră gonococi vii. S-a constatat că vaccinații cu o doză suficientă pentru producerea anticorpilor antigonococi nu s-au îmbolnăvit, în timp ce dintre infectații nevaccinați o treime au contractat blenoragia.

Vaccinul este eficace cînd pilii provin de la sușa infectantă. Cînd sușa diferă, ca urmare și antigenul, vaccinul (monovalent) nu protejează, deoarece nu se produc anticorpi anti-pili. Analizele au relevat faptul că pilii meningococului (*Neisseria meningitidis*, care produce meningita cerebro-spinală) provoacă sinteza de anticorpi antipililor tuturor gonococilor.

Se știe că *Escherichia coli* prin unele sușe face parte din flora intestinală a omului și a tuturor mamiferelor. Inofensivă în general, poate uneori să devină patogenă infectînd căile urinare, biliare sau genitale, provocînd diaree, adeseori periculoasă, chiar mortală. Cercetările au relevat că această bacterie posedă proprietăți antigenice susceptibile de a provoca un răspuns imunitar. Astfel, peretele celular posedă antigeni 0 (150 antigeni 0), capsula antigeni K (70), iar pilii antigeni H(50). Acești antigeni au fost identificați serologic prin anticorpii specifici sintetizați, ocazie cu care au fost recunoscuți

și colibacilii patogeni. Bacteriile patogene secretă toxine care atacă mucoasele. (Sinteza toxinelor este controlată de gene aflate în ADN plasmidic). Patogenitatea este astfel corelată cu existența plasmidei cu capacitate infecțioasă, dar și cu capacitatea de a adera la o mucoasă, de exemplu, de peretele intestinal. Or, de mucoasă se fixează bacteriile prevăzute cu pili. Astfel, dizenteria, uneori mortală, la viței nou născuți, este provocată de o sușă de *E.coli*, cu un singur tip de pili, antigenic bine definiți, K99. Prepararea unui vaccin cu acest pilus, K99, și administrarea la vaci cu șase săptămîni înainte de fătare, declanșează producerea de anticorpi, care ajungînd în sistemul digestiv conferă vițeilor imunitate. Un asemenea vaccin a fost preparat și împotriva infecțiilor entero-patogene produse de *E.coli* la porci.

În prezent se urmărește perfecționarea vaccinurilor piliene, eventual producerea unui polivaccin, care să confere omului o protecție durabilă atît față de infecțiile entero-patogene produse de *E.coli*, cît și împotriva altor bacterii patogene, cum sînt cele care infectează căile respiratorii sau cele ce produc cariile dentare (provocate de *Streptococcus mutans*, care se fixează pe dinți și produc acizi care atacă smalțul dentar).

Un produs misterios: interferonul

Interferonul, substanță proteică naturală, net diferită de anticorpi, este, esențial, o moleculă antivirală, secretată aproape de toate celulele mamiferelor. Este sintetizat de o celulă gazdă infectată viral, prin eliberarea interferonului în mediul intercelular, realizînd protecția unei celule vecine contra eventualilor viruși, care au determinat secretarea interferonului. Deține un rol important în apărarea nespecifică a unui organism (nu implică recunoașterea antigenului și nici elaborarea unui răspuns imun la antigenul invadant).

Să urmărim procesul: o particulă virală este adsorbită pe membrana unei celule, apoi molecula de acid nucleic viral, de exemplu ARN monocatenar, care poartă informația genetică a virusului, pătrunde în citoplasmă. Aici, monocatena de ARN-viral simbolizată +, folosind structuri celulare (ribozomi + aminoacizi), produce enzima ARN-polimeraza

care asigură fabricarea unei a doua catene de ARN simbolizată —, replica negativă (complementară) a catenei originare +. Cele două catene se asociază formînd o moleculă bicatenară de ARN. Apoi catena se constituie în matrice pentru sinteza replicativă a numeroase monocatene +, identice cu molecula virală infectantă. Acestea, prin asociere cu ribozomii celulei, sintetizează proteinele necesare învelișului sau capsidei virale. După asamblarea catenelor de ARN + cu proteinele capsidei rezultă particulele virale mature care lizează celula gazdă și vor infecta noi celule. Simultan cu formarea moleculei bicatenare de ARN, care are rol de semnal, începe sinteza interferonului. Semnalul plecat din citoplasmă ajunge în nucleu unde este înregistrat de ADN sau gena care poartă structura codificată a interferonului. Sub impulsul semnalului, gena pentru interferon din ADN cromozomal este transcrisă pe molecule de ARN mesager (mARN), care, ajunse în citoplasmă, sînt descifrate la nivelul ribozomilor, inducînd sinteza interferonului.

Așadar, sinteza interferonului este declanșată de prezența în celulă a unui virus infectant virulent. Dar, el nu apără celula producătoare, infectată, care, în final, este lizată de virus, ci este secretat în mediul intercelular, de unde circulația sanguină îl transportă în diverse țesuturi. Aici, moleculele de interferon se fixează la exteriorul celulelor, pe receptorii specifici pentru interferon aflați pe membrana plasmatică. Asociația receptor-interferon declanșează un semnal recepționat de genele din cromozomi responsabile pentru producerea reacției de apărare. Ca răspuns, sînt transcrise două tipuri de molecule de mARN: un mARN, care, după descifrare la nivelul ribozomilor, produce enzima 2-5A sintetaza care fabrică polinucleotidul 2'—5'A ce activează enzima ribonuclează prezentă în citoplasmă; și un mARN care sintetizează proteinkinaza, enzimă ce catalizează fosforilarea unui factor important al sintezei proteice: eIF2 (alături de F1 și F3 contribuie la formarea complexului de inițiere a sintezei proteice, un aminoacid cu gruparea NH_2 blocată, obișnuit metionina). Or, ribonucleaza activată și eIF2 fosforilat inhibă sinteza proteinelor virale de înveliș. Astfel, interferonul, pe o cale indirectă, protejează celulele de atacul virușilor care au declanșat producția acestuia.

Interferonul deține un potențial terapeutic considerabil, el poate nu numai preveni, dar de asemenea poate combate o infecție virală deja declarată. El este primul medicament antiviral cu aceeași eficiență pe care o au antibioticele împotriva bacteriilor. Este de asemenea un puternic medicament anticanceros: peste 150 boli pricinuite de diverse forme de cancer produse sau favorizate de infecții virale vor putea fi tratate cu această misterioasă substanță naturală (eficace împotriva a trei feluri de cancere: sarcomul — proliferare malignă a țesuturilor de origine mezodermică: țesut conjunctiv, mușchi, sistemele uro-genital, vascular și osos; carcinomul — tumoarea malignă a țesutului epitelial sau glandular; cancerele sîngelui — leucemiile).

Descoperit în Marea Britanie (în 1957), fabricat în Finlanda (în 1978), testat în Suedia și în S.U.A., interferonul are încă o utilizare restrînsă în terapeutică. Cauza? Costul exorbitant: în 1980, o jumătate de kilogram de interferon extras din sînge uman costa 22 miliarde de dolari... Nu este vorba de nici o greșeală, ci de 22 000 000 000 dolari, de 2 000 de ori mai scump decît aurul (200 000 F, franci francezi) gramul de interferon față de 100 F gramul de aur. Interferonul produs de bacterii manipulate costă de 100 ori mai puțin. Pentru comparație: piața mondială a antibioticelor este evaluată la circa 30 miliarde dolari pe an. Interferonul este caracteristic speciei, ca urmare pentru om este eficace doar interferonul uman nu și cel extras de la alte specii (în timp ce diabetul la om poate fi tratat cu insulină extrasă de la animale). El nu provoacă efecte secundare nedorite sau periculoase, cum rezultă în urma utilizării medicamentelor chimice și a radiațiilor.

Interferonul preparat are încă o puritate redusă, fapt ce face ca și rezultatele folosirii lui să fie variabile. În 1978, reputatul cancerolog J. Gutterman, de la Universitatea din Huston, a tratat cu interferon 9 femei bolnave de cancer al sînului cu metastază (la care combaterea chimică uzuală nu a dat rezultate). Efectele? La 5 bolnave a avut loc regresiuni ale cancerului după tratamentul cu interferon timp de 8 săptămîni. Interferonul este foarte eficace contra hepatitei virale și tratamentul cu această substanță poate preveni cancerul ficatului. Alte cercetări au relevat eficacitatea tratamentelor cu interferon împotriva virușilor guturaiului,

gripei, herpesului și hepatitelor. De exemplu, la bolnavi cronici de hepatită B s-a reușit eliminarea din organism a virusului cauzator prin tratamentul cu interferon combinat cu o altă substanță antivirală, adenina arabinozidă (7 reușite din 16 cazuri).

Interferonul este eficace contra virușilor și cancerelor și poate preveni cancerizarea. Anterior a fost schematizat modul de acțiune al interferonului împotriva virușilor, care constă atît în protejarea celulelor sănătoase prin limitarea concomitentă a propagării și virulenței virusului, cît și prin ameliorarea apărării gazdei. Nu se știe însă cum acționează contra cancerelor întrucît interferonul este agent antiviral și nu există nici o probă că boala canceroasă este o maladie virală. Se consideră că există mai mulți interferoni dispuși în două mari grupe: grupul I, cei care sînt induși de viruși și care sînt foarte stabili în medii cu aciditate diferită (cum sînt interferonii limfocitari și fibroblastici) și grupul II, cei care sînt induși de antigene sau mitogene și care sînt foarte instabili.

Două importante fapte au demarat și justifică uriașul interes și marile speranțe puse în interferon: eficacitatea sa contra unor cancere și slaba sa toxicitate. Extinderea utilizării interferonului în combaterea virozelor și cancerelor a fost limitată de lipsa unei metode adecvate pentru producerea și purificarea acestei substanțe. Menționăm că metoda finlandeză de producere a interferonului constă în: izolarea din sîngele donorului a leucocitelor și punerea acestora în cultura *in vitro*, în care au fost plasați viruși. Pătrunzînd în celulele albe, virușii declanșează transcripția de către gene a mARN, care comandă sinteza interferonului. După 24 de ore interferonul este izolat și parțial purificat (în 1979, Crucea Roșie finlandeză, singurul producător mondial de interferon pînă în 1980, a putut produce doar 400 mg. Pentru 100 mg de interferon se tratează 30 000 litri de sînge uman. Cu cantitatea de interferon de 400 mg pot fi tratate anual 600 cazuri). Eficacitatea se verifică *in vitro*, prin introducerea interferonului într-o cultură cu un virus nou, pe care îl distruge. Alte laboratoare au pus la punct metoda de producere a interferonului și de alte celule umane: de exemplu, din prepuțul copiilor circumciși la puțin timp după naștere, țesut bogat în fibro-

blaste (celule conjunctive, stelate sau alungite, cu numeroase mitocondrii și totipotente evolutiv), din limfocite T (celule formate de timus) și celule din splină.

Lovitură de teatru: C. Weissman, profesor la Universitetea din Zürich, membru al Societății de inginerie genetică Biogen, a reușit, în decembrie 1979, să obțină interferon produs de bacterii de *E. coli*, manipulate genetic (aceasta va permite coborîrea prețului interferonului la nivelul antibioticelor), iar echipa M. Hunkapiller și L. Hood, din Pasadena — California, a reușit, concomitent, să descifreze secvența aminoacizilor care constituie interferonul (această descoperire crează premisele sintezei pe scară industrială a interferonului).

Reușitele menționate prezintă un interes imens. Pentru transferul de la om la bacterii a genei care fabrică interferonul, Weissmann a izolat din celule albe, tratate cu virusul Sendaï (care nu provoacă viroze la om), molecule de mARN care produc sau nu interferon. Dintre moleculele de mARN a reținut 1/10 parte cu mărime mijlocie. Apoi, prin utilizarea unei enzime cunoscute, „transcriptaza inversă“, pe acești mARN a fost obținută o populație de molecule de ADN. Moleculele de ADN uman cu sau fără genele pentru interferon, în vederea detectării tocmai a genelor pentru interferon, au fost amestecate cu bacterii pentru realizarea unor grefe spontane: includerea ADN uman în plasmidele bacteriene. Apoi, bacterii schimbate sau nu sînt puse în cultură pe geloză (gel obținut prin dizolvarea în apă a agar-agarului). Prin modificarea mediului nutritiv au putut fi păstrate doar bacteriile la care grefa a reușit (restul au murit). Au fost astfel obținute zeci de mii de clone rezultate din bacteriile manipulate, dintre care unele fabricau interferon. Pentru a detecta aceste clone, în a căror plasmide erau incluse gene pentru interferon, muncă asemănătoare căutării unui ac într-un car cu fîn, a fost utilizată o tehnică specială. În final, au fost identificate 180 clone care posedau fie gena completă, fie un fragment din gena pentru interferon (gena pentru interferon se găsește în cromozomul 5 din cariotipul uman). Dintre acestea doar 6 clone posedau gena completă pentru interferon. Introducerea unor celule din aceste clone bacteriene — manipulate în culturi de celule umane inoculate cu viruși au relevat că virușii erau inhibați de prezența

interferonului uman, sintetizat de bacterii, celulele umane rămînînd intacte. Fiecare din celulele bacteriene poate fabrica una sau două molecule de interferon.

Hunkapiller și Hood au inventat un aparat, care, prin folosirea unei reacții chimice ciclice, permite forfecarea unei proteine și identificarea unul cîte unul a aminoacizilor constitutivi. Acest aparat permite întocmirea buletinului de identitate al tuturor proteinelor de pe Terra. Astfel, au fost identificați primii din cei 150 de aminoacizi ai interferonului din limfoblaste și a primilor 13 (din 150) din interferonul din fibroblaste, de la om și șoarece. Descoperirea că în succesiunea aminoacizilor, în cele două tipuri de interferoni (din limfoblaste și fibroblaste), se găsesc aceiași aminoacizi, fie că este vorba de om sau de șoarece (de exemplu, în interferonii din fibroblastele de om și șoarece leucina apare în pozițiile 3, 9, 15, 18, iar în interferonii din limfoblaste în poziția 3 apare tirozina, în poziția 6 leucina, iar în poziția 11 arginina etc.) ar putea conduce la sinteza nu numai a unor interferoni particulari ci și a unuia universal.

Astfel aventura științifică prin inginerie genetică industrială va putea ajuta medicina, dar și finanțele și implicit progresul societății.

Prima reușită în tratarea genetică a anomaliilor mintale

Debilitatea mintală asociată cu o fragilitate a cromozomului sexual X (sexul mascul este determinat de perechea de cromozomi XY, iar sexul femel de o pereche XX), la un băiat de 11 ani, a fost net ameliorată de genetistul J. Lejeune, din Paris. Aceasta este prima reușită a tratării genetice a anomaliilor mintale. În sine, reușita are un caracter particular, pe plan mai general are însă o semnificație aparte: demonstrează posibilitatea tratării deficiențelor mintale congenitale, provocate de aberații cromozomale.

Analiza microscopică a cariotipului unor limfocite din sîngele acestui copil a evidențiat prezența a 45 cromozomi anormali la 283 cromozomi normali. (Celula somatică la om posedă $2n = 46$ cromozomi).

Metoda de tratament: a injectat pacientului, timp de mai multe zile, un compus folat (5-formil-tetrahidrofolat, vitamină din complexul B). Substanța intervine în metabolismul celular, avînd un efect protector asupra cromozomului X, care, la asemenea indivizi, este deosebit de fragil și susceptibil ca în cursul diviziunilor mitotice să piardă unele segmente (se produc deleții, iar cromozomul devine deficient pentru segmentul pierdut).

Injectarea zilnică a acestui copil cu 5-formil-tetrahidrofolat a redus sensibil raportul cromozomi anormali/normali, 3 la 528. Deci aproape 98% dintre celulele pacientului au fost vindecate în urma tratamentului.

Remanierea cromozomală și celulară nu a întîrziat să se reflecteze și pe plan mintal: o ameliorare a comportamentului, mai ales, prin diminuarea stării de neliniște și de agresivitate. După circa 15 zile, timp în care celulele remaniate s-au putut diviza de 15—20 ori, tratamentul se reia spre a menține la cel mai ridicat nivel normalitatea celulelor și cromozomilor (altfel numărul cromozomilor deficienți ar crește, ceea ce ar reduce comportamentul anormal).

Se speră că aplicarea unui asemenea tratament, curînd după naștere sau chiar în timpul sarcinii (dacă prezența anomaliilor cromozomice a fost decelată prin analiza lichidului extras din amnios: cea mai profundă din membranele fetale care formează un sac umplut cu lichid, cu rol în protejarea embrionului), ar putea duce la repararea stabilă a cromozomilor prevenind comportamentul mintal anormal. Modalități analoage de tratament genetic ar putea înlătura anomaliile și din cromozomii autozomi (restul de 22 perechi de cromozomi umani).

MAREE DE PROTESTE...

Un copil geamăn cu tatăl său

Copilul geamăn adevărat cu tatăl său ar putea să împlinească vîrsta de 6—7 ani. Cine este și unde se află sînt în temă doar cîteva persoane: tatăl, geneticianul-creator și... ziaristul american D. Rorvik — povestitorul: „Copilul este

viu, crește normal, este iubit...", dar... „trebuie să poată trăi o viață normală, protejat de curiozitatea publicului."

De domeniul științei-ficțiune, iată reportajul rezumat după povestirea: „In his image: the cloning of a man" („În imagine: copia clonată a unui om"), de ziaristul amintit, tipărită în 1978[1]. Un birou somptuos! O discuție de taină. Interlocutori? Doi bărbați: gazda, un multimiliardar de 67 de ani, cu numele Max, care tronează. Are o mînă destinsă. Al doilea, un genetician de geniu, denumit simbolic Darwin. Are o mînă preocupată. Obiectivul discuției? O cerere stranie a lui Max: să fie clonat, prin prelevarea unor celule proprii, din a căror embrionare să rezulte un copil, care să fie o imagine, o copie a sa, un geamăn al său. Mijloacele? Manipularea genetică. Condițiile? Tot ceea ce știința și tehnica actuală au cucerit, precum și ceea ce geniul lui Darwin va ști să adapteze și să inventeze. Fondurile: nelimitate. Totul înconjurat de un secret strict și o discreție absolută, atît în timpul cercetărilor, cît și după realizarea obiectivului...

...Într-un laborator excepțional dotat, Darwin prelevă de la Max celule hepatice și din alte țesuturi în plină diviziune. Fiecare din aceste celule corporale, diploide, conțin în ADN-ul din cele 23 perechi de cromozomi aflați în nucleu întreaga informație genetică pe care Max a moștenit-o de la părinții săi (prin gametul mamei — ovulul, $n = 23$ cromozomi și al tatălui — spermatozoidul, $n = 23$ cromozomi, din a căror fecundare a rezultat zigotul, $2n = 46$ cromozomi, sau celula primordială din care s-a dezvoltat Max). Timp de mai bine de un an aceste celule au fost studiate în cultură *in vitro*. O atenție deosebită a fost acordată capacității și normalității diviziunilor și integrității ADN. A urmat un alt moment: de la femei tinere, neinițiate în misterioasa cercetare, au fost prelevate ovule (gameți). Dar o femeie produce lunar doar un ovul. Prea puțin! Experiențele necesită numeroase ovule. Pentru accelerarea formării ovulelor, Darwin a administrat acestor femei hormoni pituitari (hipofizari) și hormoni sexuali (gonadotrofine). El a prelevat ovulele din ovare cu cîteva ore înaintea ovulației, prin aspirație, în urma unei mici operații.

[1] Ferrara J., *Tempête autour d'un „clone" qui n'existe pas*, în „Science et Vie", Nr. 730. VII, Paris, 1978.

„Geniul" savantului anonim a condus astfel experiențele spre punctul culminant: implantarea cîte unui nucleu extras din celulele prelevate de la Max în citoplasma ovulelor obținute de la femeile anonime[1] (anterior, din ovule a fost eliminat nucleul haploid). Deci, nucleul haploid obținut din celule clonate, prelevate din corpul donorului, a fost transplantat în citoplasma unui ovul enucleat. Astfel, în laborator, au fost create celule primordiale-zigoți, care asemenea celor ce rezultă în urma unirii prin fecundare a doi gameți haploizi erau diploizi, avînd $2n = 46$ cromozomi. Noutatea constă în faptul că acești zigoți nu rezultau din procesul sexual, ci dintr-o manipulare genetică și că ambii membri ai celor 23 de perechi de cromozomi erau identici în privința genelor cu genele din celulele corporale ale lui Max.

„Zigoții" astfel obținuți au fost plasați pe un mediu de cultură *in vitro*, care asigura condiții de incubator, similare celor din uter. A fost stimulată astfel diviziunea acestor celule-zigoți manipulați, inițiindu-se embriogenizarea. Dar, pentru moment nu erau perfecționate condițiile de creștere *in vitro* a embrionului copilului. Singurul mediu perfect, desăvîrșit de evoluție, rămîne uterul femeii. În acest caz, al cui? Ana, Bell, Lolita și Sparrow (Rîndunica), femei tinere, drăguțe și virgine (pentru a elimina orice dubii) s-au pus „voluntar" la dispoziție. Viitoare „mame", dar nu pentru un ovul propriu fecundat, ci pentru un ou manipulat cu un nucleu diploid donat de Max. După segmentări succesive ale acestor zigoți, în două, patru, opt, șaisprezece, șaizeci și patru... celule, embrionii ajunși în stadiul de blastocist (blastulă — un singur strat de celule care mărginesc o cavitate centrală) au fost plasați în uterul frumoaselor „gazde" în vederea nidării (cuibăririi — fixarea în mucoasa uterină). Au eșuat numeroase tentative pînă la înfăptuirea miracolului: un „clon" nuclear de la Max și-a găsit cuibul în uterul „Rîndunicii". Și astfel, copia genetică, conformă cu Max, evident de același sex, a putut crește și s-a născut ca orice copil, în anul 1976...

[1] Tehnica transplantării nucleilor și diferențierea celulară a fost pusă la punct și descrisă de J. Gurdon, în revista *Scientific American*, Nr. 12, 1968.

Acesta este rezumatul tehnicilor, momentelor și manipulărilor care au „născut" copilul — geamăn lui Max sau istoria unei excelente teme de anticipație științifică.

Dar, pentru că Rorvik a susținut că nu a scris o carte de ficțiune, încă înainte de apariție: „În imagine: copia clonată a unui om", a produs o adevărată furtună în mediile științifice și politice din S.U.A. Savanți de renume, laureați ai Premiului Nobel, reputați geneticieni, ziariști, politicieni etc. și-au proclamat opiniile, în cunoștință de cauză sau... Pentru marea majoritate clonarea mamiferelor, cu atît mai mult a omului, nu părea curînd realizabilă, din punct de vedere biologic și tehnic și... o „maree" de proteste pentru stoparea cercetărilor și împiedicarea creării eventuale de oameni, copii conforme ale unor savanți, artiști, soldați...

Fără îndoială că acțiunea de clonare a unui om presupune depășirea unor obstacole tehnice extraordinare, mai ales că se pleacă de la o celulă prelevată de la un adult. De ce să nu se admită însă că și celula animală, inclusiv de la mamifere (dacă nu a suferit o specializare genetică), posedă totipotență. Dacă celula vegetală se dediferențiază dînd naștere unei plante întregi, nu se poate întîmpla la fel cu celula umană, căci diferențele nu sînt fundamentale?

În 1978, savantul J. Watson, laureat al Premiului Nobel pentru descoperirea, în colaborare cu F.H.C. Crick, a structurii moleculei de ADN, acorda geneticianului prezumtiv Darwin mai puțin de o șansă la un miliard pentru a reuși să învingă insurmontabilele piedici din calea clonării celulei umane. Și totuși...

...după șase luni, din domeniul ficțiunii în realitate

S-a reușit clonarea în eprubetă a unei celule umane. Comunicarea a fost publicată în apreciatul „American Journal Of Obstetrics and Gynecology" de medicul L.B. Shettles. Celula umană s-a multiplicat, a produs un embrion ajuns în faza de blastulă, care continua activ procesul de diviziune... însă după șapte zile creatorul și-a distrus opera.

Tehnicile aplicate de Shettles sînt în multe privințe asemenea celor imaginate de geniul geneticianului prezumtiv Darwin... de la un bărbat voluntar au fost prelevate din

testicule spermatogonii care erau diploide ($2n$) avînd în nucleul lor 46 de cromozomi. (Spermatogoniile sînt mai tinere decît celulele corporale și reprezintă celule-mamă din care prin diviziune meiotică rezultă gameții masculi haploizi, n-spermatozoizii, care, ca și ovulele, haploide, posedă 23 de cromozomi). Concomitent, de la femei voluntare a prelevat, cu ajutorul seringii, ovule. Din ambele tipuri de celule a fost extras nucleul. În ultima etapă nucleul diploid extras dintr-o spermatogonie a fost implantat într-un ovul enucleat. Plasat pe mediu de cultură *in vitro*, în vederea incubării, fiecare ovul astfel manipulat s-a comportat asemenea unui ovul normal fecundat de un spermatozoid. Astfel, această celulă-ou, avînd un nucleu diploid prelevat dintr-o spermatogonie a început să se dividă, să se embrioneze. În șapte zile el a ajuns în stadiul de blastocist, cînd a fost distrus...

Diferențe? Geneticianul din cartea lui Rorvik a clonat o celulă somatică și i-a condus activitatea pînă la reconstituirea unei copii a originalului, dr. Shettles a prelevat o celulă diploidă din linia germinală, activă în multiplicare (totipotentă), a cărei nucleu a substituit nucleul unui ovul. Această celulă manipulată, cu un nucleu clonat, a început să se dividă *in vitro*, să se embrioneze. Era momentul optim pentru a-l introduce în uterul unei femei voluntare. Dar el nu a făcut-o!

Teama de eșec, de coșmarul de a fi creatorul unei ființe nelegitime, scrupule? Esențialul însă a fost demonstrat: celula umană manipulată, rezultată din transferul unui nucleu diploid în citoplasma unui ovul (enucleat în prealabil), posedă capacitate de diviziune în afara corpului, *in vitro*. Cu atît mai mult se va putea manifesta această capacitate prin implantarea în uterul unei femei...

Înțelepciunea și responsabilitatea omului de știință, a geneticianului, vor ști cum să exploreze și să folosească această descoperire spre binele umanității pentru: identificarea genelor umane și clonarea lor, crearea *in vitro* a unor țesuturi specifice pentru analize genetice și transplantări, detectarea relațiilor dintre unele anomalii structurale celulare și bolile ereditare, clonarea celulelor canceroase pentru relevarea mecanismului multiplicării și a posibilităților de stopare a diviziunii etc. Aplicat asupra animalelor domestice,

clonajul va schimba revoluţionar metodele de ameliorare accelerînd spectacular procesul şi progresul selecţiei genetice.

La clonajul celular se va adăuga clonarea genelor şi transferul controlat al acestora. O realizare foarte recentă, remarcabilă, obţinută de echipa profesorului T. Wagner de la Universitatea din Ohio, în colaborare cu un laborator de cercetări ştiinţifice din Denver, confirmă posibilitatea aplicării ingineriei genetice la animale. Pe baza cercetărilor efectuate s-a reuşit ca în ovule fecundate de şoarece să fie transferate fragmente de ADN-gene, cu informaţie genetică de la iepure. Dovada transferului o constituie identificarea în şoarecii adulţi rezultaţi ca şi în urmaşii acestora (proveniţi din interîncrucişarea indivizilor dezvoltaţi din ovule manipulate) de albumine tipice de iepure şi alte trăsături proprii iepurilor. S-a obţinut astfel o linie de şoareci deosebită genetic de genitori. Începutul şi modelul există, urmează perfecţionarea, adaptarea şi extinderea acestor cercetări şi la alte specii animale utile.

„Jocul de-a embrionii"

Un anunţ din 1972, publicat în ziarele engleze, preluat de toate agenţiile de presă, făcea cunoscut faptul că dr. R. Edwards, de la Universitatea din Cambridge, a realizat implantarea în uterul unei femei a unui ovul fecundat în eprubetă. Manipulările reuşite ale acestui cercetător aveau drept scop de a ajuta femeile sterile să aibă copii. Era un scop nobil, umanitar. Primul copil conceput în eprubetă a fost micuţa englezoaică Louise Brown, care s-a dezvoltat absolut normal, fiind azi un copil voinic şi sănătos.

Realizarea în sine a reprezentat un şoc pentru cei care se temeau că aceasta ar determina răsturnări, posibil dăunătoare, faţă de căile naturale. Teama lor nu a fost însă justificată. Într-un deceniu abia dacă au fost produşi doar ceva mai mult de două duzini de „copii-eprubetă", ori rezultatele acestor implantări-sarcini nu au fost în toate cazurile anunţate? (Recent, martie 1982, s-a anunţat că la maternitatea spitalului Antoine -Béclère din Clamart, Franţa, s-a născut o fetiţă, în greutate de 3,420 kg. Este vorba de micuţa Amandine, primul copil francez conceput *in vitro*. Precizăm că în întreaga lume au fost efectuate 2 000 asemenea experienţe, dar numai 28 de sarcini au fost duse la termen, toţi noii născuţi fiind nişte copii normali. Alte 200 de femei, care pierduseră orice speranţă de împlinire a nobilei chemări a maternităţii, aşteaptă acum, pline de încredere, să devină mame).

Pe alte planuri însă, această realizare a ingineriei genetice a declanşat mutaţii incomensurabile de ordin biologic şi zootehnic.

Ispravă extraordinară: şoarece care are 3 taţi şi 4 mame

Profesorii C.L. Markert şi R.M. Petters, de la Universitatea Yale, S.U.A., după ani de lungi şi migăloase cercetări au fabricat *in vitro* un şoarece „normal" originar din fuziunea a 3 embrioni diferiţi (rezultaţi din împerecherea a 3 cupluri de indivizi). Embrionul astfel obţinut pentru creştere a fost implantat în uterul unei femele purtătoare, a 4-a „mamă". S-a născut un individ de sex femel, care în privinţa blănii era o himeră tricoloră, moştenind culoarea celor 3 cupluri de părinţi adevăraţi, era funcţională sexual şi avea, asemenea oricăruia dintre genitori, $2n = 40$ de cromozomi.

Experienţa a debutat prin alegerea unor genitori originari din trei linii pure genetic (homozigote). Cele trei cupluri de şoareci se deosebeau prin culoarea blănii: galbenă, neagră şi albă; mama purtătoare avea blana roşcată. După împerecherea galben ♀ × galben ♂, negru ♀ × negru ♂ şi alb ♀ × alb ♂, a avut loc fecundarea normală (unirea: ovul $n = 20$ cromozomi + spermatozoid $n = 20$ cromozomi = = zigot $2n = 40$ cromozomi). Apoi, ovulele fecundate — zigoţii, aflaţi în oviducte, au început să se dividă. Embrionii au ajuns astfel pînă în stadiul de 8 celule. În acest moment embrionii au fost aspiraţi din oviductele celor trei tipuri de mame (deosebite prin culoarea blănii). După extragere, pentru dizolvarea mucusului care-i învelea, embrionii au fost supuşi acţiunii unei enzime. S-a realizat apoi gruparea a cîte 3 embrioni, cîte unul din fiecare culoare: alb, negru, galben şi tratarea acestora timp de 24 ore cu o soluţie biologică (pronaza, hemaglutinine). Rolul acesteia a fost de-a induce

asocierea celor 3 grupe de cîte 8 celule embrionare, într-un singur embrion cu 24 de celule embrionare. *In vitro*, acest embrion heteroclit, dar normal, reia diviziunea celulară și trece succesiv din stadiul de morulă în cel de blastocist. Acesta este stadiul cînd, natural, embrionul se fixează în mucoasa uterină. În acest moment embrionii, în loturi de cîte 20, au fost introduși în uterul unei mame purtătoare a sarcinii (ajunsă și ea fiziologic în condiții optime pentru nidație și inițierea gestației).

Nașterea a venit cu surprize și curiozități: unii pui erau complet albi, alții galbeni, iar alții negri. Este evident că acești șoareci monocolori descindeau din grupul de celule embrionare provenite în parte de la cîte un cuplu sexual inițial, celulele celorlalți doi embrioni fiind eliminate. Un grup de pui erau bicolori: alb + negru, alb + galben, negru + galben, dovedind fuziunea a doi embrioni. Toți acești șoareci erau fenotipic și unisexuați normali (masculi sau femele). În sfîrșit, extraordinarul: un individ de sex femel era o himeră tricoloră: alb, negru, galben, rezultat posibil numai în situația fuzionării celor trei embrioni puși împreună, proveniți cîte unul din cele 3 cupluri de părinți genetic diferite. Acest individ mozaicat era normal anatomic, fiziologic și cariologic (avea $2n = 40$ cromozomi).

În natură, întotdeauna la fecundarea unui ovul participă doar un singur spermatozoid. Or, experiența descrisă demonstrează că folosirea controlată a reproducerii sexuate, asociată cu manipularea genitorilor și, în special, a embrionilor, creează condiții pentru „fabricarea" sau modelarea, conform unui proiect de lucru anterior studiat și elaborat, a unor organisme normale, dar care reprezintă sinteza genetică nu a doi, ci a șase sau mai mulți genitori.

Natura și omul, mai precis omul și natura, prin perfecționarea „jocului de-a embrionii", mai ales prin cunoașterea și dirijarea mecanismelor care permit amestecul heteroclit al celulelor embrionilor, obligați a se „rezuma" în unul singur, asigură astfel orizonturi nebănuite ameliorării intraspecifice a animalelor domestice. Iată cum ceea ce părea extrem de complicat, chiar insurmontabil — ameliorarea genetică eficientă a speciilor de mamifere, — poate deveni o acțiune de o derutantă simplitate.

Pe cînd reușite supraspecifice?

BIOTEHNOLOGII ȘI AMELIORARE

Creșterea modernă a animalelor se caracterizează prin două trăsături definitorii: pe de o parte reducerea numărului de rase, iar pe de alta lărgirea puternică a însămînțărilor artificiale.

Prima tendință, pe lîngă multiple aspecte pozitive, duce la îngustarea fondului de gene prin eliminarea raselor indigene rustice, mai puțin pretențioase, care posedă totuși caracteristici ereditare valoroase privind adaptarea la condițiile de mediu și boli, la o furajare mai naturală. De exemplu, în România[1] sînt zonate doar 3 rase de taurine, 3—4 de ovine, 4—5 de porcine, 6—7 de găini, multe dintre acestea create în alte țări și împrospătate succesiv. S-a văzut însă că importul repetat de material viu, în cazul neasigurării condițiilor optime de creștere și exploatare, poate genera unele fenomene de neadaptare, chiar de degenerare. Aceasta obligă la prezervarea materialului autohton pe cale de dispariție și folosirea lui rațională, prin infuzare, în acțiuni științifice vizînd ridicarea adaptării genetice a raselor importate ameliorate, care în procesul creării și sporirii însușirilor de producție au sărăcit în gene de rezistență și adaptare.

Însămînțarea artificială cu spermă conservată a femelelor diverselor specii s-a extins mult. Ea se aplică pe scară largă și tinde să se generalizeze la taurine și ovine, se majorează la suine, se promovează la păsări și albine. Însămînțarea artificială a femelelor are două avantaje majore: 1) se folosesc reproducători masculi mai puțini, dar de valoare individuală ridicată și cunoscută în privința producției, inclusiv reproducători importați; 2) exploatarea rațională a reproducătorilor asociată cu examinarea progresului genetic productiv.

Reproducătorii se pot folosi în rasă pură sau curată pentru menținerea sau îmbunătățirea potențialului productiv, sau în vederea încrucișării interrasiale sau interspecifice în scopul infuziei de gene, a producerii fenomenului heterozis, sau a ameliorării. Pentru ambele direcții, reușita poate fi

[1] Negruțiu E. și Șt. Oprescu: *Orientarea cercetărilor științifice în domeniul ameliorării animalelor în perioada 1979—2000 în R.S. România*, „Probleme de Genetică Teoretică și Aplicată", I.C.C.P.T. — Fundulea, vol. XII, nr. 3, 1980.

asigurată doar în cazul cunoașterii cu precizie a valorii reproducătorilor, inclusiv prin crearea unor „bănci de spermă“ congelată pe specii de la cei mai buni reproducători (pe baza capacității fecundante, a nivelului ridicat de transmitere a caracteristicilor ereditare etc.) importați, din linii valoroase depistate în țară, de la reproducători recunoscuți din rase autohtone sau străine donatoare potențiale de gene, în vederea planificării utilizării acesteia atît în rasă pură, cît și pentru infuzarea de gene autohtone, și străine, în rasele zonate importate. Pentru inducerea heterozisului, dar mai ales pentru ameliorare, obiectivele propuse, în general de interes economic și etapizarea aplicării metodelor de acțiune trebuie planificată cu o mare precizie, avînd în vedere că fixarea în descendență a unor caracteristici fiziologice superioare, inclusiv adaptive, sau productive, impune studiul a cel puțin 4—6 generații succesive. Aceasta înseamnă la taurine 20—30 ani, la ovine 12—18 ani, la porcine 10—15 ani etc. Paralel, femelele, de exemplu, la taurine (și ovine) se selecționează pe baza unei pubertăți precoce, a manifestării poliovulației și fătărilor gemelare, a scurtării intervalului între fătare și monta fecundă sau dintre gestații.

Cercetările genetice au înregistrat succese remarcabile în perfecționarea biotehnologiilor de ameliorare a animalelor. Dintre acestea, beneficii spectaculoase aduc deja fecundarea ovulelor *in vitro*, transplantul de zigoți și embrioni manipulați, clonarea fără limită a embrionului unei femele pînă la nivelul unui reproducător mascul folosit la însămînțări artificiale, prezervarea zigoților prin congelare etc. Aceste tehnologii perfecționate de manipulare a celulelor embrionare vor determina atît scurtarea duratei de modelare a unor rase noi superioare genetic, productiv și adaptiv, cît și înmulțirea rapidă, industrială, a indivizilor din genotipuri valoroase.

Ovule fecundate selecționate, „nobile“, implantate în vaci ordinare, „plebeene“

Să luăm un exemplu cunoscut: pentru ameliorarea cantitativă și calitativă a șeptelului bovin, diverse țări importă numeroși reproducători și juninci din tulpinile vestitelor

rase: Simmental și Schwiz din Elveția sau Austria, iar din rasele Friză (bălțată cu negru sau roșu), Jersey, Hereford și altele, din Danemarca, Marea Britanie și tocmai din S.U.A. Deplasarea cu trenul, avionul sau vaporul, îndeosebi din cauza răului de altitudine sau a răului de mare, obișnuit, stresează profund, uneori ireversibil, mai ales vacile gestante. La aceste neajunsuri se pot adăuga și altele cum sînt perioada lungă de carantină, cu precădere însă pericolul răspîndirii unor boli, transmisibile și la om, cum sînt bruceloza (produsă de bacteria *Brucella abortus bovis)*, febra aftoasă (produsă de un virus) etc.

Marile neajunsuri menționate, inclusiv reducerea considerabilă a cheltuielilor, vor putea fi eliminate prin folosirea rezultatelor unor ingenioase cercetări științifice. Iată-le:

...la Universitatea din Cambridge, echipa dr. D.C. Wittingham (plus S.P. Leibo și P. Mazur, 1972) a întreprins la șoareci cercetări cu o rezonanță deosebită asupra altor mamifere. Astfel, au fost folosite femele albino, de 6—12 săptămîni, cărora le-au fost injectați hormoni gonadotropi pentru a produce mai multe ovule. Apoi femelele au fost împerecheate cu șoareci masculi în vederea realizării fecundării ovulelor și producerii zigoților. După formare, aceștia au început să se dividă în 2, 4, 8 celule, embriogenizîndu-se. În acest stadiu embrionii au fost dislocați din uter cu ajutorul unui jet lichid. Apoi, prin utilizarea unor tehnici complexe și deosebit de precise embrionii au fost strînși, congelați, decongelați și reimplantați în uterul altor femele pentru nidare și continuarea embriogenizării.

Prima și ultima operație: prelevarea și reimplantarea embrionilor sînt relativ ușor de realizat, în schimb, restul operațiilor sînt deosebit de dificile. Astfel, pentru congelare temperatura trebuie scăzută progresiv, cu un grad pe minut, pînă la —196°C, după care embrionii au fost plasați în azot lichid la —196°C. În acest mediu, embrionii nu mai au funcții metabolice, nu mai „trăiesc“, stare în care pot fi conservați, în congelator, un timp nelimitat: săptămîni, luni, ani, secole de-a rîndul (bineînțeles fără pană de curent electric). Pentru readucerea la viață, embrionii sînt decongelați treptat, cu cîte 4°C pe minut. În acest fel toți embrionii revin la viață și, pe mediu de cultură, reiau diviziunea celulară: 16... 32... etc. celule. Cînd embriogeneza ajunge în

stadiul de blastocist (cînd începe diferențierea țesuturilor), embrionii sînt prelevați din mediu și reimplantați în trompele uterine ale viitoarelor mame „gazdă", pentru gestație. Succesul obținut a fost de 100%, iar puii de șoarece rezultați erau normali.

„Cirezi" în valiză diplomatică

Un complex de măsuri similare a fost aplicat și la bovine și ovine. Au fost antrenate în cercetări echipe importante din S.U.A., Franța, Marea Britanie, Australia etc. Succesele întîrziau însă. Cauza? Celulele embrionare ale acestor specii conțineau o cantitate mult prea mare de apă și vitelus (rezerve nutritive), ceea ce făcea congelarea foarte dificilă și afecta structurile. Astfel, scăderea temperaturii determina contractarea nucleului, alterarea membranelor celulei și mai ales formarea de cristale de gheață în citoplasmă. Toate acestea alterau procesele interne ale celulelor embrionare provocînd moartea embrionilor sau nașterea unor viței sau miei anormali.

Căutările și experiențele efectuate au condus în final la perfecționări care au permis congelarea primilor embrioni ovini, în 1974, iar a embrionilor bovini, în 1979. Pentru aceasta embrionii se plasează în azot, apoi temperatura acestui gaz este coborîtă, cu o rată de 10°C pe minut, pînă la —196°C, temperatură la care azotul devine lichid.

În mod normal, în lipsa fecundării, o vacă produce la fiecare trei săptămîni o ovulă (rareori două). Ca urmare, o vacă, după cuplare și fecundare, produce după o gestație de nouă luni un vițel (rareori doi). Dar pentru schimbul avantajos un singur embrion produs de o vacă în 3 săptămîni este extrem de puțin, neeficient economic. Pentru înlăturarea acestui mare neajuns în vederea stimulării ovulațiilor, vacile sînt injectate cu hormoni gonadotropi. Sub influența acestora, ovarele pot produce nu numai un singur ovul, ci cîteva zeci, chiar o sută de ovule, care se pot fecunda în prezența spermei, rezultînd zigoți → embrioni. Dar suprapopularea uterului cu embrioni produce moartea acestora. Prin tatonări s-a constatat că uterul oferă condiții normale

la un număr de pînă la 20 de embrioni. Deci cantitatea de hormoni administrată vacilor este necesar să fie potrivită pentru a determina 20 de ovulații concomitent. În acest scop vacile sînt injectate inițial cu hormoni PMSG („pregnant mare serum gonadotrophin"), extras din uterul de iapă, și apoi cu HCG („human chorionic gonadotrophin"), extras din urină de femeie, la 4 zile după primul, în momentul oestrului (fază din ciclul sexual al femelelor, caracterizată prin receptivitate deosebită față de masculi). Apoi se introduce sperma în vederea fecundării. După 5—7 zile de la fecundare, embrionii sînt prelevați în vederea congelării, prezervării și distribuirii. Acești embrioni, după decongelare, sînt implantați cîte 2—3 în uterul vacilor locale aflate în același ciclu oestrian (fără însă a fi fost însămînțate cu spermă). Pentru sincronizarea ciclului oestrian toate vacile locale cărora urmează să le fie implantați embrioni din aceeași șarjă sînt injectate intramuscular cu prostaglandine.

Prelevarea embrionilor de la vaci recordmane pentru un ansamblu de caracteristici pozitive (precocitate, producție de lapte ridicată, fătări succesive la intervale scurte și regulate, eficiente în ultilizarea furajelor etc.), la a căror fecundare a fost folosită sperma unor reproducători recunoscuți pentru potențialul lor genetic valoros, schimbă radical sistemul de ameliorare a taurinelor. Ca o curiozitate se poate reține faptul că într-un an, o singură vacă, cu aplicarea tehnicilor menționate, poate genera peste 300, da! peste 300 de embrioni, prin a căror implantare în 150 vaci-mame gazdă se pot obține tot atîția viței. Sexul acestora, în mod normal, același ca la reproducerea naturală sau însămînțarea naturală: 50% femele: 50% masculi. Ținînd seama că toate ovulele sînt de un singur tip, purtătoare a cromozomului sexului X, sexul viteilor s-ar putea influența — prin perfecționarea tehnicilor de selecție din spermă a spermatozoizilor purtători ai cromozomilor X care prin unire cu ovulul X dau naștere sexului femel (XX), respectiv, a spermatozoizilor cu cromozom Y care prin unire cu ovulul X dau naștere sexului mascul (XY; selecția spermatozoizilor s-ar baza pe principiul centrifugării).

Tehnica producerii industriale a embrionilor în scopul reimplantării în mame gazdă mai rustice (mai adaptate și mai rezistente) de pe alte meridiane, în scopul îmbunătățirii

treptate a fondului de gene și a producțiilor, apare ca o metodă extrem de potrivită și avantajoasă pentru unii crescători de vite, de exemplu, din Australia și Noua Zeelandă (de altfel, la punerea la punct a acestor tehnici a contribuit substanțial laboratoarele Universității naționale din Canberra, Australia). Fermierii din aceste țări importau animalele mai ales din Anglia și le transportau în calele vapoarelor pînă în insula Cocos din Oceanul Indian, unde rămîneau șase luni pentru carantină. Apoi erau reîmbarcate pentru destinație. Călătoria propriu-zisă și durata ei (opt-nouă luni) afectau adesea sănătatea și capacitatea de producție a animalelor. Prin noua tehnică, într-un termos de mărimea unei valize diplomatice pot fi transportați embrionii pentru regenerarea unor cirezi de mii de capete, prin implantare în uterul vacilor locale pentru gestație, naștere și alăptare.

Manipularea embrionilor și progresul ameliorării

Numărul raselor de vaci existente în exploatare în țările cu o zootehnie dezvoltată aproape că nu depășește numărul degetelor de la mîini. Acestea sînt cunoscute, practic, în lumea întreagă (pentru lapte rasele Jersey și Friză bălțată cu negru sau roșu, pentru carne rasele Charolais, Hereford, Maine-Anjou, Blonde d'Aquitania, pentru producție mixtă rasele din tulpinile Simmental, Schwiz și alte cîteva). Aceste rase aparțin speciei *Bos taurus*, $2n = 60$ cromozomi.

O colecție atît de redusă relevă dificultățile enorme ale muncii de ameliorare a taurinelor, de creare a unei rase noi. Se poate afirma, fără a exagera, că prin metodele clasice un tip nou de taurine încorporează munca perseverentă și creatoare a cîtorva generații de cercetători în conlucrare strînsă și cu selecția naturală. Ameliorarea unei caracteristici implică în medie activitatea unei generații de cercetători.

În fața acestor realități, manipularea embrionilor apare ca o „mană cerească", cu avantaje excepționale pentru ameliorarea bovinelor, în general, a taurinelor, în special. Aceste tehnici au darul de a permite nu numai intervenția genetică asupra embrionilor ci și producerea concomitentă a unui număr mare de descendenți cu același genotip. Astfel, se scurtează sensibil atît perioada modelării unor genotipuri

superioare, cît și perioada de testare care se realizează pe familii numeroase de indivizi. Un avantaj hotărîtor este și faptul că prin inducerea supraovulațiilor la noul genotip valoros, acesta poate fi înmulțit rapid, în 4 — 5 ani, pînă la nivelul a cîtorva zeci de mii de exemplare (circa 50 000 indivizi).

Să menționăm cîteva dintre realizările obținute prin manipularea embrionilor unor specii de bovine, din genul *Bos*. Din acest gen fac parte vaca, *B. taurus*, bivolul, *B. bubalis*, bantengul, *B. banteng* și zebul, *B. indicus*. În această privință și pentru activitatea de ameliorare sînt interesante experiențele profesorului australian Bede-Morris[1]. Acesta și-a adus contribuția la perfecționarea tehnicilor de prelevare, prezervare și reîmplantare a embrionilor, rasial și interrasial, în cadrul speciei *B. taurus*, precum și în activitatea de ameliorare, prin transplantări interspecifice de embrioni și inducerea fuzionării embrionilor.

Speciile *B. taurus* și *B. indicus* (ambele cu $2n = 60$ cromozomi) sînt apropiate filogenetic între ele, avînd unele trăsături comune. Ca urmare, indivizi din rasele celor două specii se hibridează sexuat dînd naștere unor descendenți normali. Pentru zonele tropicale și subtropicale, inclusiv pentru Australia și Noua Zeelandă, hibrizii între vacă și zebu au o importanță aparte: sînt intermediari în privința rezistenței la atacul foarte dăunător al căpușelor (rezistență transmisă de zebu) și în privința capacității de producție de lapte sau carne (caracteristici transmise de rasele de taurine). Precizăm că în țările calde factorul limitativ în calea răspîndirii creșterii taurinelor este reprezentat tocmai de căpușe. (Acești dăunători poartă diverse protozoare care sînt transmise taurinelor prin înțepătură, determinînd boli grave, mai ales anemie hemolitică). Dar, hibridarea între cele două specii trebuie realizată pentru fiecare generație în parte deoarece interîncrucișarea între descendenți intensifică trăsăturile uneia dintre specii, eliminîndu-le pe ale celeilalte specii. Cu alte cuvinte, descendenții fie că sînt rezistenți dar pierd capacitatea de producție, fie că ar urma să manifeste capacitatea de producție dar sînt susceptibili la dăunători și boli.

[1] Rossion P., *Embryons en conserve sans date limite*, în „Science et Vie", Nr. 753, VI, Paris, 1980.

Înrudirea dintre vacă și zebu face ca cele două specii să accepte reciproc transplantarea de embrioni, iar mamele-gazdă să asigure condițiile necesare pentru continuarea embriogenizării, gestației și nașterii. Aceasta are urmări deosebite pentru creșterea taurinelor în zonele calde. Astfel, prin transplantarea embrionilor valoroși din rasele de taurine în indivizi femele de zebu, descendenții manifestă integral bogăția în producția de lapte sau carne. Dar pentru recepționarea rezistenței la căpușe este necesară implantarea în femele zebu a unui embrion din rase de *B. taurus* și a altuia de zebu. Această descoperire s-a bazat pe următoarea experiență: într-o femelă zebu au fost transplantați doi embrioni, unul de taurine, unul de zebu. După naștere, s-a constatat că vițelul de *B. taurus* manifestă rezistență la atacul căpușelor. Evident că prezența acestei caracteristici a surprins și a impus găsirea mecanismului inductor. S-a stabilit că textura pielii vițelului nu s-a modificat, în schimb a fost stabilit faptul că rezistența la căpușe se datorează unui fenomen imunologic care a implicat globulele albe: acestea secretă anticorpi care prin difuzia în țesuturi distrug căpușele. Cauza? Trecerea în timpul gestației, prin cele două placente, a sîngelui din embrionul de zebu în cel de taurine și reciproc, fapt care declanșează reacția de imunizare.

Mecanismul de imunizare a fost testat prin inducerea fuziunii unui embrion de *B. taurus*, cu unul de *B. indicus*. Descendentul, cu patru părinți genetici, era o himeră, un mozaic de țesuturi, inclusiv pielea, care era alcătuită din sectoare alternative, originare din cele două specii. Acești indivizi manifestau față de paraziți rezistență de origine imunologică.

Cele menționate demonstrează că fuziunea unor embrioni intraspecifici și interspecifici și chiar între bovine și alte genuri ale familiei bovideelor, ca și clonarea embrionilor pot deveni metode de bază, cu eficiență sporită, în ameliorarea taurinelor. Calea clasică, lungă și complicată, nu mai este unică. Există noi și multe posibilități de a scurta... de a simplifica lucrurile. Astfel, în lumea științifică a făcut vîlvă realizarea recentă a unui hibrid intergeneric, între ovine și caprine, cu spermă prelevată de la berbec și ovule prelevate de la capră. Originalul hibrid, care a fost botezat — gudad,

a fost obținut de o echipă de cercetători din Australia. Fecundarea a fost realizată *in vitro*, iar ovulele fecundate, zigoții, au fost implantate în uter de capră. Embriogenizarea a decurs normal, iar indivizii capră-oaie au o blană frumoasă, o carne gustoasă și sînt fertili (spre deosebire de hibrizii sexuați care sînt sterili).

Producerea de miei gemeni monozigoți

Un ou fecundat, zigotul, este o monocelulă care în condițiile din uter începe să se dividă, să se segmenteze în două celulele identice. Aceste celule de clivaj, rezultate din segmentarea primară a oului, sînt numite blastomere. Obișnuit, cele două celule rămîn împreună și continuă să se dividă sincron determinînd embriogenizarea și morfogeneza. În cazuri rare, din motive încă necunoscute, clivarea zigotului este urmată de separarea, în spațiul uterin, a celor două blastomere. Apoi, fiecare se comportă ca un ou de-sine-stătător, nidează, se embriogenizează și se diferențiază independent. Astfel, la om, bovine, ovine apar, se formează și se nasc gemeni monozigoți. Aceștia au genotipuri identice și întotdeauna același sex, ca urmare, în condiții de mediu asemănătoare dezvoltă și fenotipuri, practic, identice (germenii rezultați din două sau trei ovule, fecundate cu spermatozoizi diferiți, se numesc dizigotici, respectiv trizigotici, au genotipuri și fenotipuri deosebite și pot fi unii de sex femel, iar alții de sex mascul).

Pentru cercetătorul englez S.M. Willadsen, aceste cunoștințe, dar mai ales cele dezvoltate pe baza manipulării embrionilor au constituit un arsenal pe care l-a îmbunătățit și utilizat cu succes. Astfel, prin punerea la punct a unei metode originale a reușit să separe cele două celule-blastomere ale unui ou fecundat, și, datorită totipotenței acestora, să obțină gemeni monozigoți. Experiența efectuată la ovine a constat în următoarele: din uterul unor oi donatoare, după ovulație și montă, sînt extrași embrioni aflați în stadiul de două celule, care sînt plasați într-o soluție salină tampon, bogată în fosfat. În acest mediu, cu ajutorul unui instrumentar microchirurgical este desfăcută „zona pellucidă", care învelește oul, iar cele două blastomere sînt aspirate, separate

şi fiecare este reinjectată într-o „zonă pellucidă" în prealabil evacuată de oul propriu. Apoi, fiecare pereche de blastomere este inserată într-un manşon protector de agar, care, în vederea embriogenizării, este implantat în oviductul unor oi recipient între prima şi a doua zi a ciclului ovarian (oviductele au fost în prealabil legate la joncţiunea cu uterul pentru a opri migrarea şi nidarea embrionilor). În noul mediu blastomerele manifestă totipotenţă, comportîndu-se asemenea unor zigoţi individuali: încep să se dividă şi să iniţieze primele stadii ale embriogenizării. După un interval cuprins între 84 şi 108 ore de la implantare embrionii sînt prelevaţi în vederea studiului comportării. Sînt reţinuţi doar aceia ajunşi în stadiul de morulă-blastulă, restul sînt eliminaţi.

Prin aplicarea acestei tehnici, Willadsen, în 1978, a obţinut 16 perechi de embrioni monozigotici în stadiile de morulă şi blastocist pe care le-a reîmplantat în oi mame adoptive, între a 5-a şi a 7-a zi a ciclului. Zece oi au avut o gestaţie şi naştere normală, din care 5 au produs perechi de gemeni monozigotici, iar 5 cîte un singur miel. Deci, 15 miei din 61 embrioni, a două celule, prelevaţi iniţial pentru separare şi incubare şi 16 perechi de embrioni implantaţi pentru gestaţie (12,3% miei faţă de totalul blastomerelor, 24,5% miei faţă de numărul embrionilor prelevaţi şi 46,8% faţă de morulele şi blastociştii implantaţi). Rezultatele, deşi modeste, sînt încurajatoare dată fiind creşterea preciziei şi frecvenţei reuşitelor în etapele finale. Ele dau speranţe că, prin perfecţionarea tehnicilor de prelevare a embrionilor blastomerici şi de manipulare a acestora, se va spori sensibil eficienţa metodei de clonare a oului după prima segmentare şi regenerarea de gemeni monozigotici. Tehnica este aplicabilă şi la vaci şi...

Clonarea oului fecundat după prima segmentare, urmată de constituirea blastomerelor în zigoţi potenţiali, datorită manifestării totipotenţei şi regenerarea unor indivizi normali din punct de vedere biologic are însemnate avantaje atît pentru cercetarea fundamentală şi dezvoltarea metodologiilor de ameliorare, cît şi pentru producţie. Ea permite atît multiplicarea materialului valoros, mai ales prin asociere cu inducerea supraovulaţiilor, cît şi o rapidă evidenţiere a valorii individuale a ambilor genitori. În acelaşi timp, gemenii monozigotici, prin identitatea genotipului, constituie un material inegalabil ca valoare, pentru cercetarea efectelor mediului, a capacităţii de ingerare, metabolizare şi convertire a elementelor nutritive din nutreţuri, rezistenţei la boli şi dăunători etc.

Tehnicile de manipulare şi clonare descrise pot fi aplicate asupra embrionilor umani? Fără nici o îndoială!

Experienţele continuă...

IV
O AFACERE BĂNOASĂ — INDUSTRIA GENEI —

CA ÎN FILMELE DE AVENTURI

...Vînd 1 000 000 a 35... vînd... vînd... cumpăr 50 000... cumpăr 50 000... plus 5... cumpăr 100 000... plus 10... cumpăr 100 000... plus 15... cumpăr... cumpăr 200 000... plus 20... plus 20... cumpăr... cumpăr 300 000 plus... 25... cumpăr... plus 35... plus 35... cumpăr plus 40... cumpăr... cumpăr plus 50... plus 54... cumpăr... cumpăr... cumpăr... gong!

Povestea a durat 20 de minute și s-a petrecut în dimineața zilei de marți 14 octombrie 1980, la Bursa din Wall Street. Incandescenta scenă a fost descrisă de foarte seriosul „Wall Street Journal": acțiunile noii firme americane „Genentech" puse în vînzare au fost literalmente smulse. Într-un interval de numai 20 de minute, valoarea acțiunilor emise la 35 dolari a erupt la 89 dolari... Impresiile unui martor ocular, un financiar din San Francisco, relatate de același ziar: „Niciodată n-am văzut așa ceva; doar Genentech n-are nici un produs în vînzare pe piață, ea nu obține practic beneficii, iar domeniul în care lucrează cere mai multă cercetare decît industria; este un sector de mare risc financiar". Atunci? Cum se face că într-un timp scurt întreprinderea a cîștigat un renume internațional? Ce a putut determina o asemenea febră în mediile financiare?

Pe scurt! Un om de 32 ani, R. Swanson, cu o formație științifică (biochimist) și comercială, a avut flerul să adulmece enormele posibilități industriale ale ingineriei genetice[1].

---

[1] Harrois — Monin F., *Des dollars et des gènes*, în „Science et Vie", Hors Serie, Nr. 133, XII, Paris, 1980.

În 1974 a înființat, în San Francisco, o mică companie privată, Kleiner et Perkins, pentru finanțarea și asistarea întreprinderilor mici și mijlocii, care lucrau în sectoare tehnologice de vîrf. Astfel, societatea„ K et P" a învestit bani în „Cetus", o mică întreprindere din Berkeley, care exploata comercial, de 4 ani, descoperirile biologiei moleculare. În acei ani tehnicile de manipulări genetice bîjbîiau. Abia în anul 1972, H. Boyer și S. Cohen, de la Universitatea din California, au constatat că unele enzime „de restricție" pot tăia într-un punct precis o moleculă de ADN. Descoperirea a deschis era „manipulărilor genetice" și crearea „ADN recombinat". Meritul lui Swanson de-a învesti bani în „Cetus" derivă tocmai în sesizarea imenselor posibilități comerciale ale acestei tehnici aflată în faza experimentării. Ca urmare, a luat ființă un embrion de laborator de inginerie genetică. Au fost solicitați ca asociați renumiți geneticieni, printre care viitorul laureat al Premiului Nobel, în 1980, P. Berg, părintele manipulărilor genetice (primul care utilizează enzimele de restricție pentru secționarea ADN în poziții cunoscute; el este inițiatorul tehnicilor aplicate în prezent în toate laboratoarele din lume care permit fabricarea de către microorganisme a tot felul de substanțe, în special terapeutice: insulină, interferon uman etc.) și H. Boyer, un cercetător tînăr și strălucit (menționat deja în lucrare). În timp ce primul a refuzat, al doilea a acceptat poziția de asociat (rămînînd mai departe la Universitate). Astfel, în aprilie 1974, se naște Genentech, cu un singur salariat (Swanson) și un asociat (Boyer), prima companie axată exclusiv pe utilizarea tehnicii ADN recombinat pentru crearea unor produse noi. Capitalul: 200 000 dolari proveniți de la vechea companie „K et P". Puțin! În aprilie 1977 ajunge la 1 000 000 dolari prin reunirea unor fonduri provenite de la 4 societăți (Mayfield Fund, International Nickel, Innova și Sofinnova).

Primul succes: Paralel începe activitatea. Genentech încheie contracte cu două centre de cercetări californiene: Universitatea și Centrul medical de cercetări medicale de la City of Hope. Curînd este înregistrat primul succes științific. Avînd mai puțin de 10 salariați, în noiembrie 1977, grație manipulărilor genetice, compania anunță obținerea *soma-*

tostatinei (hormon al creierului, descoperit în 1973, de echipa R. Guillemin, la San Diego, California). De acest hormon cercetătorii au mare nevoie deoarece afectează secreția altor hormoni ca insulina și hormonul de creștere și probabil este util pentru tratamentul diabetului, a hemoragiilor gastrice și a unor dezordini hormonale. Dar cantitățile obținute prin sinteză sînt extrem de mici și costă enorm: 30 000 dolari gramul, de 150 ori mai mult decît aurul. Or, comunicarea Genentech că a produs această substanță prin tehnica ADN recombinat naște speranța obținerii unor cantități care să acopere nevoile medicale urgente, la un preț care să scadă pînă la 300 dolari gramul.

Acest succes ridică încrederea în Genentech în casieria căreia este vărsat, în aprilie 1978, încă un milion de dolari de către 5 companii (International Nickel, Mayfield, Innova, Sofinnova și Hillman Corp.). Astfel, se ajunge la 30 salariați, din care aproxiativ trei pătrimi cercetători. După încă o lună capitalul crește cu încă 500 000 dolari (prin vînzarea a 250 000 acțiuni).

Al doilea succes. Pe baza unui nou contract al Genentechului cu Centrul medical City of Hope, la începuturile anului 1978, împreună cu cercetătorii acestui centru, s-a reușit să se grefeze gena insulinei umane într-o plasmidă a bacteriei *E. coli*. Ca urmare, bacteria manipulată a căpătat capacitatea de a produce insulina asemănătoare celei produsă de om. Deficiența în acest hormon cauzează diabet, boală care afectează în lume multe milioane de oameni. 80% din piața insulinei, în valoare de 137 milioane dolari, este controlată (în 1980) de gigantul farmaceutic Ely-Lilly. Dar, insulina extrasă prin metoda clasică din pancreas de porc și vacă nu este identică cu insulina umană, de aceea adeseori provoacă reacții alergice. Aceasta relevă însemnata contribuție a Genentechului, care, prin bacteriile manipulate, produce insulină umană perfect compatibilă. Pentru a nu pierde supremația pe piața insulinei, compania Ely-Lilly a încheiat cu Genentech un contract pe termen lung, de multe milioane, pentru a cerceta posibilitățile care asigură producerea industrială a insulinei umane prin inginerie genetică. Insulina produsă va fi comercializată în exclusivitate de finanțator (care construiește o uzină în valoare de 40 milioane dolari).

Al treilea succes. În august 1978, Genentech încheie un contract pe termen lung cu filiala californiană a societății suedeze AB Kabi, primul producător mondial al hormonului de creștere la oameni, HGH („Human Growth Hormone"). Obiectivul contractului: producerea acestui hormon grație ingineriei genetice. (În organism este secretat de hipofiză și joacă un rol primordial în dezvoltarea omului. HGH afectează creșterea oaselor și țesuturilor la începutul vieții; hipo, respectiv hiperfuncția hipofizei produce nanismul și respectiv gigantismul. Pînă în prezent acest hormon a fost produs în cantități extrem de mici prin extragere din cadavre). La mai puțin de un an de la încheierea contractului (în 1979), Genentech anunța producerea HGH prin intermediul bacteriilor manipulate de *E. coli*. Prin contract Genentech urma să furnizeze companiei AB Kabi o cantitate definită procentual din HGH pe care-l va fabrica, restul cantității produse o va putea comercializa în S.U.A. și Canada. S-a trecut la testarea HGH pe animale și oameni.

Al patrulea succes. O remarcabilă reușită a ingineriei genetice în laboratoarele Genentech este producerea, în iulie 1979, a *timozinei alpha* (o substanță antivirală). În mod natural, timozina este secretată de timus și are rolul de a stimula sistemul imunitar întărind rezistențele naturale (slăbite, de exemplu, de tratamentele chimice ale cancerului, după cum are și rolul de a mări eficacitatea tratamentului cancerelor creierului și plămînilor). Valoarea deosebită a acestei reușite este dată de tehnica obținerii: cercetătorii de la Genentech cunoscînd secvența acizilor aminați, care constituie acest hormon — timozina alpha 1, i-au pus cap la cap, iar apoi prin decriptaj genetic au stabilit structura mARN și apoi a genei care comandă sinteza acestui hormon. Ei au sintetizat această genă pe care au inserat-o în molecula inelară de ADN dintr-o plasmidă din citoplasma bacteriei *E. coli*. Drept urmare bacteria manipulată a produs timozina alpha 1. În prezent, este testată clinic de Institutul Central al Cancerului din S.U.A.

Această bacterie manipulată a adăugat 13,3 milioane dolari la bugetul Genentech. În plus, în septembrie 1979 societatea Lubrizol a cumpărat 1 000 000 acțiuni ale Genentech-ului pentru 10 000 000 dolari în numerar. Lubrizol

este o întreprindere de produse chimice industriale, de aditivi pentru lubrifianți și benzine. Această tranzacție relevă că Genentech își va diversifica activitatea, depășind sectorul farmaceutic (medicamente și cercetări medicale) ocupîndu-se și de aspecte cum sînt energia (recuperarea asistată de petrol din zăcămintele exploatate în care rămîne în roci pînă la 60 % și conversia în etanol a biomasei vegetale prin bacterii recombinate) estimată la 25 miliarde dolari.

Al cincilea succes. La începutul anului 1980 firma Genentech, care între timp a ajuns la 120 salariați, a comunicat obținerea unui nou produs: *proinsulina*, precursorul moleculei de insulină. Proinsulina nu are efecte terapeutice, dar reprezintă o materie primă foarte potrivită pentru fabricarea industrială a insulinei.

Al șaselea succes. În septembrie 1978, firma lui R. Swanson a semnat un contract cu gigantul farmaceutic Hoffmann-Laroche. Obiectivul: producerea interferonului, supranumit mina de aur a industriei farmaceutice. În lume, numeroase laboratoare s-au angajat să producă această substanță imunitară naturală, extrasă din sînge, care declanșează sinteza de către celule a proteinelor antivirale, inhibînd reproducerea virușilor. (Despre interferon s-a vorbit în capitolul precedent. S-a arătat astfel că în 1979, Crucea Roșie finlandeză, singurul producător mondial, a putut produce 400 mg de interferon, din 45 000 l sînge uman. Prima sinteză de interferon realizată de o bacterie manipulată genetic a fost obținută în decembrie 1979, în cadrul societății Biogen, de membrul acesteia, C. Weissmann, de la Universitatea din Zurich).

După numai 20 de luni de la încheierea acestui contract, în iunie 1980, Genentech a anunțat că *E. coli*, manipulată, produce interferoni de două tipuri: de tip leucocitar și de tip fibroblastic și că au fost obținute deja cîteva micrograme.

Activitatea antivirală a acestor interferoni a fost dovedită prin testări în culturi de țesuturi și pe maimuțe. Foarte importantă este capacitatea de sinteză și secreție a interferonului de către bacteriile manipulate. Astfel, un litru de cultură de bacterii produce pînă la $2{,}5 \times 10^8$ sau 250 000 000 de unități de interferon, acesta fiind cel mai înalt nivel de producție obținut vreodată. De 200 de ori mai productivă

decît metoda finlandeză, potrivit căreia din celulele dintr-un litru de sînge uman se extrag doar 2 milioane unități de interferon; milionul de unități clasice costînd 50 dolari. Înseamnă că interferonul Genentech, datorită imensei productivități a bacteriilor manipulate, este de 200 de ori mai ieftin decît interferonul finlandez. Implicațiile comerciale ale unei astfel de productivități sînt incontestabile. (O unitate de interferon reprezintă cantitatea din această substanță necesară pentru diminuarea la jumătate a unei infecții virale în aproximativ un milion de celule dintr-o eprubetă).

Firma Hoffmann-Laroche, prin contract, are dreptul exclusiv de a comercializa în lumea întreagă interferonul produs de Genentech. Și cît de vastă, de mănoasă și de vertiginoasă va fi piața interferonului datorită utilizării acestuia ca substanță antivirală și anticanceroasă?

Peripețiile celulelor umane KG—1

În capitolul precedent a fost prezentată metoda finlandeză de producere a interferonului din sînge uman ca și tehnica elvețiană a obținerii unei sușe din bacteria *E. coli*, în care a fost transplantată gena umană care produce interferon. Să urmărim mai departe istoria palpitantă a descoperirilor, studiilor și experiențelor care au asigurat în final crearea de către echipa de cercetători de la Genentech a bacteriei *E. coli* posesoare a genelor — interferon uman.

...1977. Primul episod: într-un spital din Los Angeles, un om de 59 de ani este în pragul morții, evoluția cancerului este fatală. Dar, în interesul științei el acceptă o intervenție dureroasă: o puncție de măduvă osoasă, pentru prelevarea de celule formatoare de sînge, care la el dădeau naștere celulelor canceroase. Cauza? Aceste celule aveau o genă mutantă care determina proliferarea de elemente leucocitare tinere. După două luni bolnavul a murit, dar celulele sale denumite KG-1 vor rămîne, la propriu și la figurat, nemuritoare: ele permit producerea interferonului. Prelevatorii acestor celule, P. Koeffler și D. Golde, de la facultatea de medicină a Universității din Los Angeles, care le „botează" KG-1, reușesc să le cultive *in vitro*.

Al doilea episod: după cîteva luni un eşantion de celule KG-1 este trimis la „National Cancer Institute" din Bethesda, lîngă Washington. Aici, cercetătorul R. Gallo constată că ele secretă interferon.

Al treilea episod: Gallo trimite eşantioane cu celule KG-1 lui S. Pestka, care se interesa de interferon la „Roche Institute of Molecular Biology" (finanţat de Hoffmann-Laroche) din New Jersey. După doi ani de cercetări, prin clonarea celulelor şi îmbunătăţirea mediilor de cultură, Pestka a obţinut clone celulare KG-1 ameliorate, care secretau o cantitate record de interferon (cam în acest timp, decembrie 1979, Weissmann a comunicat obţinerea la Biogen a bacteriei manipulate producătoare de interferon).

Episodul patru: sesizînd că potenţialul terapeutic al interferonului poate reprezenta o cifră comercială de sute de milioane şi chiar miliarde de dolari, firma Hoffmann-Laroche încheie contractul cu Genentech. Ca urmare, celulele KG-1 ameliorate de Pestka sînt predate societăţii Genentech, a cărei cercetători apreciază că producţia poate fi considerabil sporită, dacă genele care comandă sinteza interferonului vor fi grefate în bacterii. Dar care sînt aceste gene?

Episodul cinci: Roche Institute solicită reputatului centru medical şi de cercetări City of Hope Medical Center din California să determine măcar în parte secvenţa aminoacizilor din molecula de interferon secretat de celulele KG-1. Rezultatul a fost transmis cercetătorilor societăţii Genentech.

Episodul şase: pe baza secvenţei aminoacizilor, cercetătorii Genentech au realizat descifrarea secvenţei bazelor azotate din structura ADN aflat în genele care controlează sinteza interferonului. Apoi, din citoplasma unor celule KG-1 a fost extrasă întreaga cantitate de ARN mesager, abundent în aceste celule sintetizatoare de cantităţi mari de interferon. Moleculele de mARN, posesoare ale codului genetic pentru sinteza interferonului, au fost folosite pentru identificarea ADN, respectiv a genelor purtătoare ale informaţiei pentru interferon.

Episodul şapte: iunie 1980, după identificare, genele-interferon, extrase din celule KG-1, au fost grefate, prin manipulări adecvate, în bacterii *E. coli*. Acestea se înmulţesc şi secretă cantităţi mari de interferon cu activitate antivirală.

Ultimul episod? D. Golde, unul din cei doi cercetători de la Universitatea din Los Angeles, care a reuşit să cultive *in vitro* celulele KG-1, consideră că acestea nu trebuiau date lui Pestka. (Or, tocmai acesta a reuşit să amelioreze considerabil producţia de interferon a celulelor KG-1, fapt care a făcut ca acestea să devină o marfă valoroasă). Ca urmare, Universitatea din Los Angeles, a cărei angajaţi sînt Koeffler şi Golde, considerînd că celulele KG-1 au fost folosite fără autorizaţie de Roche Institute, iar societatea Genentech le-a exploatat comercial va cere „drepturi de autor" pentru exploatarea comercială a celulelor...

Atunci cînd se va realiza pentru om şi nu va mai reprezenta o concurenţă între societăţile producătoare în căutarea maximului de profit, sporirea producţiei de interferon va aduce un enorm serviciu sănătăţii oamenilor...

Mărimea segmentului de ADN prelevat din celulele KG-1 şi grefat în bacterii este de 961 (1 000) de baze azotate. Pe acest segment se realizează transcripţia unui ARN mesager de aceeaşi lungime în baze încadrate în 333 de codoni mARN. De-a lungul acestui segment de ADN se disting 4 subsegmente alcătuite dintr-un număr variabil de baze azotate: 60, 69, 495 (plus un codon stop din 3 baze azotate) şi 333. Partea iniţială a acestui segment de ADN, alcătuit din 60 de baze azotate, nu poziţionează aminoacizi (este o „genă fără expresie"). Urmează apoi un segment de ADN alcătuit din 69 baze azotate (23 codoni mARN), care codifică un polipeptid format din 23 aminoacizi, numit „peptidă semnal" (începe cu tripletul de baze ADN: timină, adenină, timină, TAT, pe care se transcrie codonul mARN: adenină, uracil, guanină, AUG, ce codifică aminoacidul metionina şi se încheie cu tripletul de baze ADN: citozină, citozină, guanină, CCG, ce transcrie codonul mARN: GGC pentru glicină). Segmentul de ADN se continuă apoi cu secvenţa principală sau propriu-zisă a genei interferon, formată din 495 de baze azotate pe care se transcrie mesajul pentru 165 codoni, respectiv 165 aminoacizi. (Interferonul, prin cei 165 aminoacizi, are o greutate moleculară de 019 390). Această secvenţă de ARN mesager începe cu codonii UGU GAU CUG → pentru aminoacizii cistină, asparagină, leucină etc. şi se termină cu codonii →AGU AAG GAA... pentru serină, lizină, acid glutamic. În mARN urmează un codon

stop, UGA, ce intrerupe mesajul. Începe apoi segmentul ultim al ADN, respectiv mARN, format din 333 de baze azotate. Nici ultima parte nu poziționează aminoacizi (deci și aici este o „genă fără expresie"). Structura prezentată este caracteristică pentru gena-interferon din celulele KG-1. Interferonii sînt produși de cîteva tipuri de celule (fibroblaste, limfocite T, leucocite ș.a.), ceea ce înseamnă că există tot atîtea gene-interferon.

Astfel, profesorul C. Weissmann, de la Biogen, inventatorul primei bacterii producătoare de interferon prin grefarea în aceasta a genei-interferon din globule albe umane, consideră că există cel puțin 8 gene, dar posibil 15 gene, care dețin codurile pentru sinteza interferonilor la om. Probabil, interferonii au funcții diferite în activitatea antivirală și anticanceroasă.

* * *

Cooperarea cu mediile universitare și cu industria și asocierea unor echipe de cercetători tineri de prim rang a făcut ca Genentech să reușească să dezvăluie lumii întregi imensele posibilități ale ingineriei genetice. Realizările sale majore, obținute în mai puțin de 4 ani de existență, prin cointeresarea giganților industriei farmaceutice, i-au conferit o poziție științifică și economică care o deosebesc net de alte companii similare. Aceasta i-a permis ca, la 14 octombrie 1980, să vîndă la Bursa din New York 1 000 000 din acțiunile sale, vînzare care a zguduit Wall Street-ul și a adus firmei zeci de milioane de dolari, în bani gheață (un milion $\times$ 89 dolari = 89 milioane dolari). Iată speranța că Genentech va putea deveni total independentă, în planificarea cercetării, în producție și desfacere.

O cifră cu rezonanță: în 1980, Genentech a depus la Curtea Supremă a S.U.A. 200 cereri pentru brevetarea a tot atîtea microorganisme manipulate. Scopul? Protecția!

Din laboratoare universitare, în uzinele giganților industriali

Vizitatorii „Muzeului Memorial G. Mendel", din Brno, Cehoslovacia, rămîn surprinși de simplitatea inventarului folosit de părintele geneticii în cercetările care l-au condus, în 1865, la descoperirea legilor eredității. În multe privințe, laboratoarele pentru cercetări de genetică, pînă către anii '60, puteau fi asemuite în dotare cu laboratorul mendelian. Apoi, inventarul și aparatura laboratoarelor, situate în general în universități sau instituții științifice legate de medii universitare, au început să se complice, echipele de cercetători să crească, iar anvergura și importanța descoperirilor a început să depășească mediile de specialitate. Lucrările și realizările, dar mai ales cercetările bazate pe inginerie genetică lăsau să se întrevadă perspective fantastice, nebănuite: pentru transformarea agriculturii și zootehniei, a farmaceuticii, a tratamentului bolilor genetice, pentru „domesticirea" microorganismelor și folosirea lor în cele mai diverse domenii (în producerea alimentelor, hormonilor, antibioticelor, vitaminelor, proteinelor, carburanților — de exemplu, alcooli — îngrășămintelor agricole, insecticidelor, în minerit etc. etc.). Toate acestea prin intervenție în genotip, prin încorporarea unor gene purtătoare de funcții dorite și precise.

Atenția principală s-a concentrat asupra bacteriilor, obiect excelent pentru cercetare și manipulare genetică. Cum microorganismele naturale sînt folosite pentru a prepara vin, bere, brînzeturi, pîine și mai recent antibiotice și vitamine, de ce n-ar fi folosite și bacteriile manipulate pe scară mare, industrială? Așa s-a făcut că din laboratoarele cu obiective științifice, bacteriile manipulate deja sau în perspectiva manipulării, au trecut la o fabricație industrială cu randament economic. O asemenea extindere necesită eforturi mari de cercetare. Menționăm, în continuare, o serie de societăți din țările occidentale.

Primul model este Genentech (ca și Cetus care în 6—7 ani a făcut progrese uimitoare în domeniul biotehnologiilor, prin dezvoltarea cercetărilor privind ADN recombinat). Al doilea model este societatea „Biogen" (Elveția) creată de cinci țări occidentale, dar cu capitaluri mai ales americane și canadiene (date de companiile Schering-Plough și International Nickel), iar în poziția a treia „Genex", creată în 1977, în Rockville, S.U.A. La aceste societăți specializate se adaugă departamentele amplu dezvoltate de inginerie genetică de la giganții industriali: Hoffmann-Laroche, Glaxo, Hoechst, Upjohn, Merck, Ely-Lilly și Searle în dome-

niul farmaceutic; General Electric, Unilever ş.a., în domeniile energiei şi chimiei. În aceste ultime direcţii au fost obţinute realizări şi sînt urmărite proiecte şi de alte companii, de exemplu, GULF Science and Technology Co. (S.U.A.), Rhône—Poulenc, C.E.C.A., S.N.E.A. (în Franţa) ş.a.

În Franţa, în mai puţin de un an, au fost constituite trei grupuri cu scopul cercetărilor de inginerie genetică. Astfel, prin cooperarea unor organisme publice, cercetători, industrii şi finanţe, în februarie 1980, a fost înfiinţat „Grupul de geniu genetic", G.3. Acesta reuneşte Institutul Pasteur (51% din acţiuni), CNRS (29%), INRA (10%) şi INSERM (10%) şi are misiunea de a finanţa şi realiza cercetări de inginerie genetică pentru fiecare dintre participanţi (sănătate: hormoni, enzime, vaccinuri; agronomie: bio-fertilizanţi; ecologie: protecţia mediului ambiant, depoluare; energie, chimie). Cercetările se vor efectua la Institutul Pasteur, iniţial cu o echipă de 12 persoane şi un buget anual de 2,5 milioane franci. La puţin timp după înfiinţarea G3 legat de instituţii de cercetare, Banca din Paris şi Ţările de Jos (Paribas), întreprindere tipic capitalistă, şi-a creat propria societate de geniu genetic „Transgen" (Strasbourg), cu sprijinul puternicelor grupuri industriale: Elf-Aquitaine, BSN-Gervais Danone, Moët-Hennessy, Air Liquide (cu un capital de 80 mil. franci). Apoi, a fost creată o a treia societate denumită „Génética", legată de compania Rhône-Poulenc. Toate acestea au acelaşi obiectiv general de cercetare. Aceste trei grupuri se confruntă însă cu o problemă majoră: lipsa cercetătorilor de prim rang şi raritatea şefilor de proiect pentru alcătuirea unor echipe la nivelul cerut de experienţele de inginerie genetică. Potrivit estimărilor, în Franţa există doar 70 de cercetători corespunzători (1981), dar aceştia sînt integraţi în cercetarea publică, care s-ar dezorganiza prin plecarea unora dintre ei. Ca urmare, grupurile franceze caută cercetători în S.U.A., Anglia, R.F. Germania, dar... într-un climat de concurenţă, caracteristic societăţii de consum.

Alte grupuri Rapidase, producătoare de enzime, aparţinînd grupului olandez Gest-Brocades, „Orsan-Eurolysine", (grupul belgian Lafarge), societatea americană Corning Glass, cu un centru la Fontainebleau, specializat în catalize

enzimatice şi fermentaţie etc. şi altele în S.U.A., Japonia... se orientează spre ingineria genetică.

Cîteva cifre! În Japonia, în fiecare an, 300 doctori în microbiologie se adaugă celor 4 000 specialişti de înalt nivel ştiinţific, care activează deja (dintre care 3/4 în industrie). Spre deosebire, în Franţa, Institutul Pasteur, care cu tot sprijinul masiv al statului, a funcţionat zece ani cu efective constante, va putea, în viitor, crea doar vreo 50 posturi, din care 15—20 cercetători, mai ales microbiologi.

* * *

Cultura controlată a microorganismelor ca şi inducerea unor schimbări ereditare în funcţiile metabolice şi detectarea unor genotipuri mai utile, în special la bacterii şi ciuperci, devine o preocupare obişnuită şi pentru alte ţări.

Este interesant de menţionat faptul că, de exemplu, în Ungaria a căpătat o extindere meritorie cercetările care contribuie la dezvoltarea cunoştinţelor privind genetica microbiană. Asemenea cercetări se desfăşoară în cîteva unităţi specializate: Institutul de genetică, Institutul de fiziologia plantelor şi Departamentul de microbiologie al Universităţii din Seghedin (oraş în care în iulie 1979 s-a ţinut al 5-lea simpozion internaţional, privind protoplaştii), Institutul de cercetări pentru medicamente, Institutul central de cercetări alimentare din Budapesta etc. Printre microorganismele luate în studiu sînt specii din genurile *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Pichia* ş.a. În vederea inducerii variabilităţii şi obţinerii unor genotipuri mai productive la diverse specii au fost izolaţi protoplaşti. Aceştia sînt utilizaţi atît ca material iniţial de selecţie pe diverse medii de cultură, cît şi pentru obţinerea de hibrizi somatici şi... transformare. De exemplu, în cadrul Departamentului de microbiologie al Universităţii din Seghedin, prin fuziunea unor protoplaşti diferiţi de *Penicillium chrysogenum* au fost obţinute suşe cu o producţie sporită de penicilină. Tot prin fuziunea protoplaştilor, la Institutul central de cercetări alimentare din Budapesta au fost obţinute suşe de drojdii mai bogate în metionină etc. În unele cercetări abordate în colaborare cu Institutul de fiziologia plantelor din Seghedin şi Departamentul de biochimie al Universităţii Leida, Olanda, se urmăreşte transfor-

marea celulelor de tutun prin intermediul ADN din plasmida Ti din *Agrobacterium tumefaciens*.

Tehnicile de inginerie genetică puse la punct prin cercetarea bacteriilor, potrivite atît la microorganisme, cît și la plante superioare, sînt în curs de experimentare și aplicare în diverse laboratoare din U.R.S.S. (Institutul de genetică moleculară — Moscova, Institutul de biologie moleculară și genetică — Kiev, ș.a.), din R.P. Chineză (Institutul de genetică — Beijing, Institutul de botanică — Beijing), precum și în institute de genetică din R.D. Germană, Iugoslavia etc. În țara noastră tehnicile de inginerie genetică, a folosirii ADN recombinat, sînt studiate și în curs de aplicare la microorganisme la Institutul de virusologie „St.S. Nicolau" din București. Aceleași tehnici: izolarea unor gene, studierea și transferul lor în alte organisme încep să se experimenteze și în laboratoare care au ca obiect de cercetare mecanisme genetice la organisme superioare.

MICROBI „DOMESTICIȚI"

Acum o sută de ani, în 1878, biologia s-a îmbogățit cu termenul de „microb", care indica un organism viu de talie mică, microscopic. Dintre microbi fac parte unele alge albastre și bacteriile (unicelulare), precum și levurile (ciuperci microscopice unicelulare) și mucegaiurile (ciuperci microscopice filamentoase). Dintre microbi, bacteriile au fost supuse celor mai intense cercetări. Ca urmare, de exemplu, bacteria *Escherichia coli*, care trăiește normal în intestinul uman, este cunoscută în multe dintre detaliile structurale și funcționale. Prin tehnici adecvate această bacterie a fost manipulată genetic într-o asemenea măsură încît unele genotipuri pot fi considerate creații sau ființe artificiale. Așa cum s-a menționat, tehnicile folosite asupra *E.coli* au fundamentat ingineria genetică, axată pe manipularea ADN. Așa s-a realizat „domesticirea" unor bacterii, ca și a unor levuri și mucegaiuri.

Scopul „domesticirii" bacteriilor a fost folosirea în interesul omenirii a trăsăturilor metabolice ale acestora, dintre care

unele sînt de-a dreptul fascinante. Să notăm: bacteriile reprezintă cele mai mici forme de viață organizată, autonomă. De exemplu, *E.coli* are 1—2 μ lungime și 0,5—1 μ diametru, dar raportul suprafață/volum la bacterii este mai mare decît la orice altă viețuitoare. De exemplu, la om raportul suprafață/volum este doar de 0,3, la oul de găină 1,5, la amibă 400, iar la stafilococ (coci dispuși în grămezi neregulate) 120 000.

Pentru creștere și reproducere o bacterie fabrică între 3 000 și 6 000 tipuri de molecule diferite (din care au fost identificate în întregime doar 600) fără să aibă nevoie decît de o sursă de carbon (glucoză). Ea își trage energia din oxigen în mediu aerob (respirație), iar în lipsa acestuia (anaerob) poate utiliza un compus organic (prin fermentație). Conține în cromozom informația genetică pentru circa 3 000 de gene, iar în citoplasmă se găsesc circa 18 000 ribozomi, care asigură sinteza proteinelor și a unor molecule mai mici: aminoacizi, baze azotate, zaharuri simple, acizi grași și a unor macromolecule: enzime, acizi nucleici, polizaharide, lipide, vitamine.

Bacteriile sînt mai active decît orice altă ființă. Astfel, în timp ce un om poate consuma greutatea sa în zahăr în 250 ore, o bacterie lactică poate utiliza într-o singură oră o cantitate de lactoză mai mare de 10 000 ori decît greutatea proprie. Are un ciclu vital de 20 de minute după care dă naștere la două celule fiice; după 100 de minute rezultă 32 celule. Înseamnă că, ipotetic, dacă condițiile de spațiu și hrană ar corespunde, dintr-o singură celulă inițială, cu 1 μ diametru și greutatea 5×10^{-13}g, după 44 ore ar rezulta o masă egală în mărime cu aceea a globului terestru.

În mediu de cultură pură, necontaminată, sușele mutante din diverse specii de bacterii, izolate din mediu natural, aer, apă, sol, iar uneori de pe materii organice mai mult sau mai puțin descompuse, pot răspunde obiectivelor urmărite. Astfel, au fost detectate sușe supraproducătoare de antibiotice, de substanțe de creștere (vitamine, acizi aminați), proteine sau alte substanțe. Detectarea și izolarea noilor sușe producătoare este o operație foarte dificilă care impune atît diferențierea mediilor, inocularea, cît și observarea înmulțirii și analiza sintetizatelor. Un exemplu: pentru descoperirea unei actinomicete (bacterie filamentoasă) producătoare de oxitetraciclină au activat 55 cercetători, 2 ani, timp în care au fost

studiate în eprubetă peste 134 000 de suşe, izolate din peste 5 000 de soluri diferite.

Din cele menţionate se desprind trei trăsături ale microorganismelor utile, care fac din ele nişte producători inseparabili de progresul şi viitorul omenirii: 1) extraordinara variabilitate determinată de mutaţii genice şi de recombinarea ADN, care permite adaptarea la variaţiile condiţiilor de mediu, la cultura în laborator şi în fermentatoarele industriale, pe medii simple (o sursă de azot şi una de carbon); 2) raportul suprafaţă/volum, net în favoarea microorganismelor, care permite o absorbţie ridicată a elementelor nutritive şi un metabolism intens cu un randament sporit; 3) marea varietate de reacţii, inclusiv sinteza unor substanţe complexe imposibil de obţinut prin sinteza chimică, cum sînt enzimele, vitaminele, alcaloizii, antibioticele etc. utilizate în terapeutică, industria alimentară, în industriile chimice etc. Aceste proprietăţi ale microbilor domesticiţi constituie o garanţie a încununării cu succes a muncii de selecţie a unor suşe noi, valoroase în privinţa sintezei substanţei dorite. Obişnuit, după izolare, noile suşe sînt supuse unui proces de „domesticire" în vederea ameliorării randamentului şi a mecanismelor de reglare a sintezei, toate controlate genetic. Ameliorarea se realizează prin inducerea mutaţiilor genice sau prin transferul, cu ajutorul manipulărilor genetice, a unor gene străine corespunzătoare obiectivelor. Eficienţa ameliorării şi randamentul de producţie al unor suşe microbiene sau specii în totalitate rezultă din tabelele următoare[1]:

Superproducţia de produse de fermentaţie la bacterii (mg/litru)

Produsele	Necesităţi	Producţie	Raport produs/necesităţi
Acid glutamic	300	90 000	300
Lizină	250	50 000	200
Vitamine:			
B_2	0,5	7 000	14 000
B_{12}	0,001	100	100 000

[1] Rivière J., „*La domestication des microbes producteurs*", în „Science et Vie", Hors Serie Nr. 133, IV, 12, Paris 1980.

Randamentul zilnic în proteine sintetizate de diverse organisme

Organisme (1000 Kg)	Proteină produsă într-o zi în Kg	Randament zilnic în %
Bou	1	0,1
Soia	10	1
Levuri	100 000	10 000
Bacterii	100 000 000 000	10 000 000 000

Analiza cifrelor cuprinse în cele două tabele demonstrează randamentul diurn uriaş al microorganismelor în general, al bacteriilor în special, precum şi superproducţia, mult peste necesităţi în diferite substanţe, realizată de către bacterii.

Eficienţa ameliorării poate fi susţinută de exemplul următor: în 1939, prima suşă de *Penicillium* folosită de Fleming producea 2 unităţi de penicilină pe ml, în timp ce în 1972, suşele comercializate produceau peste 15 000 unităţi/ml. Să mai menţionăm că o suşă din bacteria *Corynebacterium glutamicum*, izolată dintr-un sol japonez, pe un mediu de cultură cu glucoză şi amoniac, are o mare capacitate de a fabrica acid glutamic, aminoacid implicat la om în numeroase procese metabolice (dezaminare, transaminare etc.) şi funcţionale ale creierului, ficatului, rinichiului etc.; acidul glutamic este singurul aminoacid care îndeplineşte rol de substrat energetic pentru celula nervoasă. În 1980, producţia de acid glutamic a fost de peste 200 000 tone.

„Maşini" mai productive, cu randamente ridicate

Biotehnologia este o ştiinţă inginerească, tehnică. Ca „maşini" sau „aparate" de producţie ea foloseşte organisme sau organite celulare: bacterii, ciuperci, celule vegetale sau animale, mitocondrii, plastide sau biocatalizatorii lor, cum sînt enzimele. Obiectivul: producerea la scară industrială de molecule sau substanţe de interes economic (acizi nucleici,

hormoni, enzime, vaccinuri, antibiotice etc.); materia primă: glucoza (pentru fermentație) sau alte componente ale biomasei.

Succesul unei operații biotehnologice depinde de sușele de microorganisme și clonele celulare sau organitale folosite. Rezultă necesitatea de a selecționa genotipuri sau „mașini" cît mai productive, cu randamente tot mai ridicate. Schimbarea proprietăților secretorii sau adaptarea la o funcție precisă este posibilă fie prin mutație genică, fie prin inginerie genetică.

Mutația genică stă la baza ameliorării proprietăților secretorii ale mucegaiurilor (*Penicillium notatum* și *P. chrysogenum*). Astfel, datorită mutației recurente în mecanismul genetic de secretare a penicilinei, de la sușe cu producții neînsemnate s-a putut ajunge la sușe mutante cu o producție extraordinar de mare: 80 g la un litru de mediu de fermentație. În plus, mutația contribuie și la diversificarea producțiilor. De pildă, într-o sușă, mutația într-o genă a cauzat pierderea enzimei E_5 (penicilina este produsă de un sistem de 5 gene-A B C D E, fiecare producînd cîte o enzimă, E_1—E_5, care prin realizarea unui substrat intermediar intervine specific în lanțul de reacții ce asigură secreția). Ca urmare, în mediul de fermentație, în loc să se acumuleze penicilină G, se acumulează acidul amino-6-penicilanic, 6-APA. Interesantă este interpretarea și folosirea acestei mutații: plecînd de la 6-APA, chimia organică nu trece numai la penicilină G, ci la cîteva mii de molecule, inclusiv antibiotice importante, cum sînt ampicilina și carbenicilina, folosite în combaterea bacteriozelor. După aceste descoperiri a urmat o adevărată „vînătoare" de noi antibiotice: tetracicline, streptomicine (antibacteriene), antracicline, daunomicine, bleomicină (anticanceroasă) etc. Din fiecare asemenea grup de substanțe, produse de sușe diferite, pot fi separate sau criblate (cernute) molecule mai utile, mai eficiente terapeutic, reactiv etc.

Utilizarea mutasintezei, prin detectarea unor sușe mutante în care dispare o enzimă necesară în lanțul de reacții pentru biosinteza unei substanțe utile, poate fi justificată și cu alte exemple. Astfel s-a descoperit o sușă care nu mai sintetiza enzima E_3, necesară producerii unui substrat intermediar (D) pentru sinteza penicilinei G. Din această cauză pentru realizarea de către sușa respectivă a penicilinei mediul trebuie completat cu substratul D, care este transformat de E_4 în 6-APA, care la rîndul lui este metabolizat de E_5 în penicilina G. În locul substratului D în mediu poate fi plasată o substanță analoagă structural cu D, care poate fi recunoscută de E_4, și, ca urmare, se va obține o penicilină G ușor deosebită de tipul normal. Unele mutante pot fi defective pentru celelalte enzime (E_1, E_2 sau E_4), ca urmare, substratul normal poate fi substituit cu diverși analogi structurali. În acest fel rezultă peniciline G variabile, cu avantajul de a manifesta un spectru antibiotic mai larg și de a avea o toxicitate mai mică pentru om. Unele dintre noile antibiotice, deosebit de active împotriva ansamblului de clase de bacterii, sînt foarte toxice și pentru om. Or, disocierea acestor proprietăți este posibilă prin mutasinteză, așa cum s-a reușit în cazul gentamicinei (obținerea analogilor structurali intermediari este posibilă și poate fi grăbită mult prin sinteză chimică). S-a menționat deja că *E.coli* produce între 3 000 și 6 000 de diferite molecule, multe dintre ele necunoscute. Această aptitudine secretorie extraordinară este posibilă datorită numărului uriaș de enzime: circa 2 000, sintetizate de diverse gene-alele normale și mutante. Totul, pe un mediu de cultură cu glucoză + energie (din oxigen în condiții aerobe — respirație, sau un compus organic în condiții anaerobe-fermentație). Pentru farmacie și chiar pentru industria alimentară, energetică etc. prezintă un interes deosebit ca aceste enzime în loc să fie lăsate să sintetizeze numeroase molecule necunoscute și, ca urmare, neutilizabile pentru om, să fie „puse la lucru" în vederea transformării controlate a unei molecule, să zicem A (disponibilă și ieftină), într-o substanță B, de un interes infinit superior. Acest proces chimic a fost numit *biotransformare* sau *bioconversiune* (este tratat într-un capitol următor). De exemplu, în timp ce chimia organică este ineficientă, un microorganism, o arthrobacterie, găsită după cîțiva ani de cercetări, are capacitatea de a scinda catena laterală a colesterolului și de a-l converti în hormoni steroizi, vitamina D etc. (Colesterolul se găsește în gălbenușul de ou — 2,9 %, în țesutul nervos — 26 —44 %, în grăsimi tisulare 2,4‰ ș.a.; se produce circa 80 000 t/an). Prin bioconversie din colesterol se produce

hormonul androstadien-1,4, dien-3,17 sau AAD, un produs intermediar pentru fabricarea unui anticoncepţional comparativ cu cel pe bază de diosgenină, extras din planta *Dioscora*.

Ingineria genetică poate schimba radical, prin substituire, diverse gene ale microorganismelor utile. Astfel, includerea genelor responsabile în plasmide, urmată de plasarea acestor vehicule într-o celulă recipient, face posibilă integrarea în cromozomul celulei gazdă a genei străine. În noul genotip, gena transferată poate funcţiona normal, realizînd o sinteză proprie caracteristică. Aşa au fost obţinute bacteriile manipulate care sintetizează insulină, somatostatină, hormoni de creştere, interferoni ş.a., iar în perspectivă se speră transferul genelor *Nif* („nitrogen fixation"), de la bacteriile fixatoare de azot atmosferic, în unele plante de mare interes economic cum sînt porumbul, grîul, floarea-soarelui etc. Manipulările se completează cu bacteriile depoluatoare, cu cele folosite în exploatări miniere şi altele. Se poate deduce că ingineria genei va crea o industrie bazată pe gene care va concura cu o eficienţă tot mai mare industria chimică de sinteză.

TEHNOLOGIA ENZIMATICĂ

Enzimele sînt catalizatori biochimici, specifici vieţii, care asigură desfăşurarea proceselor metabolice (catabolism şi anabolism). Sînt solubile, macromoleculare, de natură organică, termolabile, produse de organismul viu, iar activitatea lor este specifică faţă de o anumită substanţă sau un anumit tip de substanţe sau substrat, şi sînt dependente de anumite condiţii de mediu: pH, temperatură, prezenţa unor activatori etc. Enzimele pot fi activatoare sau inhibitoare pentru un anumit proces metabolic, după cum pot fi şi degradatoare ale unor substanţe (enzime amilolitice, glicolitice, proteolitice etc.). Aceste substanţe acţionează fie în interiorul celulei (endoenzime), fie în mediul extracelular (exoenzime) cum sînt cele utilizate în industria fermentativă (pepsina, tripsina etc.).

„Deviza" enzimelor: a face şi a desface continuu substanţe...

Fabricarea enzimelor este dificilă şi foarte scumpă, stabilitatea lor este slabă şi pot fi utilizate o singură dată. Aceste trăsături păreau greu de învins. Cercetările efectuate de microbiologi, enzimologi şi ingineri biotehnologi au dus la înţelegerea faptului că enzimele pot constitui „instrumente" cu posibilităţi deosebite. S-a stabilit astfel că enzimele pot fi produse natural de diverse microorganisme, de exemplu, de către levuri. Apoi, pentru o folosire rentabilă la scară industrială, după extragere şi purificare enzimele sînt fixate, fie prin formarea unei legături chimice, între unele substraturi naturale (celuloză, agaroză), sintetice (polistiren, poliacrilonitric) sau minerale (argilă, sticlă poroasă), fie prin absorbţie simplă sau prin includerea în microcapsule cu pereţi semipermeabili. Stabilizarea şi utilizarea continuă în reactoare cu substrat fluidizat se poate realiza şi prin fixarea enzimelor pe particule magnetice. Fixate astfel, enzimele pot fi reciclate deoarece ele se prezintă sub formă solidă şi nu lichidă. În timp ce în stare lichidă enzimele se denaturează în 24 ore, în urma fixării pot funcţiona cîteva luni, fapt care face ca preţul de cost să scadă sensibil.

După fixare enzimele, împreună cu suporţii, se introduc în bioreactori de diverse dimensiuni (chiar de zeci de mii de tone)[1]. Asemenea bioreactori au început să producă. De exemplu, în reactori enzimatici se produce lactoza din lactoser (partea lichidă care rămîne din lapte după îndepărtarea coagulului format sub acţiunea fermenţilor; conţine albumină şi globulinele din lapte, precum şi cea mai mare parte din lactoză şi săruri minerale; lactoza este un dizaharid compus dintr-o moleculă de glucoză şi una de galactoză, deci lactoza poate fi utilizată pentru producerea glucozei şi galactozei (izomer al glucozei), precum şi fructoza din glucoză (transformarea în fructoză intensifică dulceaţa). În reactorii în care au fost introduse două tipuri de molecule (reactori bimoleculari): amoniac şi acid fumaric, enzima imobilizată aspartaza a catalizat acidul aspartic. Reactorii în care sînt introduse enzime cu acţiune secvenţială asigură

[1] Seroussi Sophie: „*Mettre les enzymes au travail*" în „Science et Vie", Nr. 765, VI, Paris, 1981.

transformări chimice profunde ale moleculelor substratului conducînd la sinteza dirijată a unor molecule noi, specifice.

Imobilizarea enzimelor pe suporți insolubili și folosirea acestora în bioreactori, în flux continuu, este în curs să devină o tehnologie larg utilizată în domeniile alimentar și farmaceutic. Aceasta va avea implicații economice și social-politice dintre cele mai importante, deoarece procedeele enzimatice pot fi competitive sau complementare proceselor chimice clasice (industriei fermentării). De exemplu, în S.U.A., transformarea amidonului porumbului de către glucoamilaze în glucoză → fructoză se realizează de acum în stație pilot (amidonul este hidrolizat de α-amilază în dextrine și apoi în maltoză, maltotrioză și glucoză, iar γ-amilaza eliberează glucoză și maltoză). Moleculele separate de glucoză în prezența unei glucoizomeraze sînt apoi transformate în fructoză, sub forma unui sirop (cu un conținut ridicat în fructoză) cu o putere de îndulcire superioară zaharozei (care este formată dintr-o glucoză și fructoză). Acest suc dulce este foarte potrivit în industriile alimentare, în special în fabricarea băuturilor răcoritoare (inclusiv Coca-cola). În prezent, unele cercetări de inginerie genetică întreprinse de societatea californiană Cetus au drept obiectiv găsirea unei biotehnologii de solidificare a siropului prin cristalizarea fructozei. Prin generalizarea acestui procedeu, S.U.A. speră că pînă în 1990 va putea asigura o jumătate din consumul intern de zahăr, eliberîndu-se de necesitatea importului acestui produs. În anii '70, S.U.A. producea anual aproape 3 mil. tone de zahăr din porumb. (În S.U.A., valoarea totală a utilizării industriale a enzimelor ca valoare adăugată, în 1975, s-a ridicat la aproape 500 milioane dolari).

S-a menționat că o celulă bacteriană sintetizează circa 2 000 enzime, care, de altfel, sînt prezente în orice celulă vie. Dar, numărul celor cunoscute este mult mai mic, iar al celor folosite industrial este extrem de redus. Astfel, numărul enzimelor industriale (cu o cifră de afaceri de 200 milioane dolari/an în S.U.A.) atinge doar cifra 10. Dintre acestea 4 grupe de enzime reprezintă 80% din comerț și anume: amilazele (α și β amilaza, de origine bacteriană; hidrolizează polizaharidele→glucoză, maltoză), amiloglucozidazele (origine fungică; hidrolizează total amidonul, dextrinele→glucoză, bere, alcool), proteazele (papaina, bromelaina de origine vegetală; tripsina, pepsina, cheagul de origine animală sau și fungică, proteaze bacteriene și fungice; hidrolizează peptide, amide sau esteri, caseină, proteine→peptide sau aminoacizi; limpezirea berii; producerea pîinii, produselor de cofetărie, brînzeturilor, medicamentelor) și glucoizomerazele (origine fungică; izomerizarea glucozei în fructoză și producerea siropului cu conținut ridicat în fructoză). La aceste enzime, larg folosite, se adaugă: pectinaza (origine fungică, fructe → suc de fructe, vin), celulaze (origine fungică; hidrolizează biomasa, celuloza → glucoză, alcool), lipaze (origine fungică; hidrolizează gliceride → acizi grași, gliceroli), invertaza (levuri; hidrolizează zaharoza → glucoză și fructoza → zahăr invertit), lactaza (levuri, fungi; hidrolizează lactoza → glucoză, galactoză → siropuri) și pancreatina (extrasă din pancreas; acționează ca o protează + o amilază + o lipază reunite; hidrolizează legături peptidice, polizaharidice și gliceridice → glucoză, aminoacizi, acizi grași etc.; utilizări în industria farmaceutică). O ultimă enzimă dar cu un mare viitor este amino-acilaza, care asigură producerea α-aminoacizilor.

Pe scurt despre aminoacizi: sînt substanțe organice din a căror polimerizare rezultă proteinele. În structura aminoacizilor intră una sau cîteva grupări carboxilice (—CO.OH) și una sau cîteva grupări aminice (—NH_2). După poziția grupării aminice față de cea carboxilică aminoacizii se clasifică în α, β, γ, Δ... Cea mai mare parte a aminoacizilor naturali sînt α-aminați... Sînt sintetizați de celule pe seama hexozelor, pentozelor sau acizilor cetonici. Unii aminoacizi sînt esențiali pentru organismul animal. Prezența acestora în alimente este indispensabilă deoarece organismul nu-i sintetizează. Așa sînt: lizina, triptofanul cistina + metionina, histidina, fenilalanina, treonina, leucina + izoleucina, valina.

Lizina este așadar un aminoacid esențial, iar în cereale aproape că lipsește (în porumbul obișnuit) sau este prezentă în cantități mici (la grîu 2,8 g/100 g proteină). Spre deosebire, o leguminoasă — soia are circa 7% proteină din bob, iar oul de găină 6,97 g/100 g proteină. (Necesarul în 24 de ore al unui om este de 4,2 g/100 g proteine). Din această cauză furajarea animalelor impune completarea rațiilor cu

leguminoase boabe, mai ales cu soia. Este adevărat că lizina poate fi fabricată şi prin sinteză chimică, dar aceasta nu poate fi utilizată pentru îmbogăţirea cerealelor şi alimentaţie. Cauza? Sinteza chimică produce un amestec, în părţi egale, din doi izomeri optici: Δ-lizină şi α-lizină.

Organismul animal asimilează însă numai α-lizina (levogiră), iar celălalt izomer nu. Mai mult Δ-lizina la o doză mare devine toxică pentru organism. Această situaţie şi inexistenţa unui procedeu chimic pentru separarea celor două lizine la scară industrială a făcut ca sinteza chimică a lizinei să nu aibă efecte economice scontate. Impasul a fost înlăturat prin procedee enzimatice. Astfel, potrivit procedeului pus la punct de INSA, în Franţa, într-un bioreactor lizina sintetică a fost combinată cu un reactiv X, asupra căruia a acţionat o enzimă imobilizată. Enzima taie selectiv legătura stabilită între α-lizină şi reactivul X, dar lasă neschimbat compusul α-lizină — X. Apoi α-lizina este extrasă din reactor, în timp ce compusul Δ-lizina — X este supus căldurii pentru ramificare, în vederea reciclării. În acest mod Δ-lizina neutilizabilă este transformată în α-lizină. În Europa, singurul producător de lizină este societatea Eurolizina, instalată la Amiens, Franţa, care lucrează după un brevet japonez. Societatea produce 7 500 t lizină/an (în perspectivă 11 000 t).

După un procedeu similar celui folosit în producerea lizinei, în Japonia se produce α-metionină (levogiră), cîte 20 tone în fiecare lună...

Au fost prezentate anterior doar enzimele catalizatoare ale reacţiilor de degradare (hidrolazele) care permit utilizarea glucidelor, proteinelor, lipidelor în alimentaţie, în medicină etc. De asemenea, s-a vorbit despre izomeraze care catalizează rearanjări în sînul moleculei substratului (de exemplu, glucoza —$C_6H_{12}O_6$, aldohexoză, în fructoză $C_6H_{12}O_6$, cetohexoză), prin oxidoreducere, transferuri intramoleculare ş.a.

Există însă şi enzime care catalizează oxidoreducerea — oxidoreductazele (transferă electroni de la un donor la un acceptor), altele care catalizează transferul unui grup chimic dintr-o moleculă în alta — transferaze, liaze şi ligaze. Aceste enzime sînt încă puţin folosite, importanţa lor însă este deosebită dacă ne gîndim că ele pot cataliza oxidarea,

dar mai ales reacţiile de sinteză a noi molecule plecînd de la molecule mai simple.

Ingineria enzimatică explorează orizonturi noi în diverse direcţii şi, ca urmare, a obţinut realizări remarcabile în domeniile menţionate deja: farmaceutică, alimentaţie, chimie. Utilizarea enzimelor este încurajatoare în activitatea de reducere a reziduurilor pesticidelor şi poluanţilor chimici din mediu (apă) şi din produsele alimentare. Un rol major îl vor avea însă enzimele în energetică: prin tratarea biomasei cu celulaze, amilaze, amiloglucozidaze se realizează hidroliza celulozei, polizaharidelor, amidonului şi dextrinei în glucoză →alcool etilic→energie, după cum prin asocierea fotosistemelor vegetale cu hidrogenaza bacteriană se poate obţine hidrogen → energie. Aceste aspecte fac obiectul altui capitol.

Enzimele şi dozajul substanţelor

În sînge, dar şi în diverse fluide industriale (farmaceutice, alimentare etc.) se află o serie de substanţe de interes biologic. Pentru dozarea acestora se face apel la diverse metode analitice. Printre acestea o extindere tot mai mare capătă dozajul enzimatic al diferitelor substanţe, cu enzime libere. Astfel, pentru dozarea zahărului din sînge, proba dată se tratează cu glucozoxidază, care transformă glucoza în acid gluconic şi apă oxigenată. Aceasta (apa oxigenată) oxidează un colorant care poate fi determinat colorimetric. În industrie, în vederea dozării acidului glutamic, soluţia se tratează cu glutamat decarboxilaza care determină producerea de CO_2 etc.

Metodele de dozaj enzimatic au devenit mai ieftine şi mai precise prin utilizarea în acest scop a enzimelor fixate, folosite asemenea unor electrozi (de fapt, ele acoperă electrozii clasici). Au fost puse la punct două tipuri de electrozi din enzime: enzima în pudră depusă pe electrod, şi enzima inclusă într-un gel (un poliacrilamid) sau o membrană (un polimer) care se pune în jurul electrodului. (Enzimele transformă substanţa dozabilă într-un produs la care electrodul este sensibil).

Primul tip de electrod-enzimă are aplicaţii medicale şi industriale multiple şi este folosit printre altele pentru doza-

rea acidului lactic, iar al doilea tip pentru dozarea glucozei. Metoda este foarte simplă şi durează doar cîteva secunde, deoarece curentul, care se stabileşte între electrozi, se compară cu o curbă etalon, iar rezultatele privind doza supusă analizei apar pe tabloul de afişaj al analizatorului. Aceste tipuri de analizatoare, foarte rapide şi economice, bazate pe captori enzimatici, sînt adaptate şi pentru dozarea continuă în fermentatoarele de tip industrial, în care relevă cantitativ atît substanţele utile, cît şi cele toxice, poluante (şi din apă şi aer prin intermediul proprietăţilor lor inhibitoare) etc. Astfel, aceşti captatori pot doza continuu glucoza, lactoza, ureea, unii aminoacizi şi altele.

INVENTATORI DE ORGANISME VII

Dr. Ananda M. Chakrabarty, de origine indiană, cercetător la firma General Electric, este primul posesor al unui brevet de invenţie a unei fiinţe vii. Brevetul, eliberat în 1980, de United States Patent and Trademark Office (Biroul american de brevete) acordă titularului dreptul de proprietate naţional şi internaţional asupra unei bacterii inventată în laborator. Titlul noii fiinţe: bacterie *Pseudomonas* „mîncătoare de petrol" (o asemenea fiinţă nu există în natură).

Bacteria care „mănîncă" petrol a fost obţinută astfel: din patru bacterii diferite au fost prelevate plasmide care posedau ADN extracromozomic cu o informaţie ce controla sinteza unei enzime capabilă să digere cîte o hidrocarbură. Astfel, una digera camfor, alta naftalenă, a treia salicilat, a patra octan. În laborator, cu ajutorul iradierii, cu raze ultraviolete sau X, a fost indusă ruperea urmată de fuzionarea acestor patru tipuri de plasmide. S-a obţinut astfel o plasmidă care reunea ADN-ul celor patru plasmide originare. Plasmida de sinteză a fost apoi „grefată" într-o bacterie din genul *Pseudomonas*. Prin observaţii s-a stabilit că bacteria astfel „inventată" se reproduce normal. În plus, plasată pe un mediu cu petrol brut, noua bacterie se comportă excelent, „ca la ea acasă": ea consumă cu lăcomie acest substrat alcătuit din mai multe tipuri de hidrocarburi şi, ca urmare, se reproduce foarte intens. S-a găsit astfel un remediu excepţional pentru transformarea mareelor negre în accidente minore (bacteriile degradează petrolul brut în gaz carbonic şi proteine). Pînă la inventarea acestei bacterii, care digeră rapid şi eficient mareele negre, adevărate catastrofe pentru uscat, mări şi oceane ca şi pentru plajele deschise, petrolul brut scurs din tancuri sau vidanjat clandestin în apropierea coastelor era tratat cu „depoluatori poluanţi"-detergenţi, deosebit de costisitori.

Ingineria genetică poate asigura cele mai mari profituri industriale din lume, mai mari poate decît cele ale electronicii

Brevetarea primei fiinţe vii este un eveniment şocant. El preocupă în mod deosebit pe filosofi, jurişti, dar interesează în cel mai înalt grad şi pe geneticieni, economişti, societatea şi mediul, ale căror progrese sau regrese pot fi puternic influenţate de noile fiinţe vii. Să derulăm întîmplarea. Au trebuit 8 ani...

...în luna iunie 1972, la U.S. Patent and Trademark Office, Chakrabarty a înaintat dosarul pentru brevetarea invenţiei sale „bacterie manipulată capabilă să sintetizeze enzimele care asigură degradarea hidrocarburilor" (petrolului brut). Ciudăţenie! În decurs de cîteva luni cererea este aprobată, apoi anulată, pe motiv că un proces biologic nu este brevetabil. Decizia de respingere a fost confirmată apoi şi de forurile însărcinate cu revizuirea cererilor refuzate (Board of Appeal, Court of Customs and Patent Appeals). Astfel s-a ajuns la Curtea Supremă a S.U.A. După lungi dezbateri pe teme filosofice, etice, practice etc., aceasta a decis, cu 5 voturi pentru, contra 4, că un organism viu „manipulat" poate fi brevetat. Şi astfel după 8 ani de polemici, pro şi contra, biroul naţional american de brevete a acordat brevetul de inventator al unei fiinţe vii dr. A.M. Chakrabarty.

Societăţile de cercetări de inginerie genetică au primit cu deosebită satisfacţie recunoaşterea oficială a „fabricării de mîna omului a unui organism care nu există în natură".

Îndată, societățile americane de cercetări genetice au depus sute de cereri de brevete pentru alte bacterii manipulate. O „campanie" de cercetări dusă „cu ușile închise", de concurență pentru obținerea de profit maxim în laboratoarele vestitelor societăți de inginerie genetică: Genentech, Genex, Cetus, Biogen, Amaco, Eli-Lilly, Hoffman-Laroche și multe altele, este în plină desfășurare pentru inventarea a noi ființe vii, originale. La acest efort susținut de creiere de prim ordin, giganții industriali caută să ocupe poziții tot mai angajate. Cu tot mai multă convingere se afirmă că prin inginerie genetică pot fi obținute mari avantaje financiare și economice, mai mari poate chiar decît cele realizate de electronică. În plus, noile „mașinării" vii, reprezentate în special de bacterii manipulate, au avantajul că produc foarte eficient, cu cheltuieli minime de energie, prelucrează o materie primă reînnoibilă — biomasa, în general, ieftină, și nu sînt poluante.

În curînd: degradarea pesticidelor și plasticelor

Prima invenție brevetată deschide orizonturi deosebit de promițătoare. Să urmărim chiar motivația la cererea de brevet a lui Chakrabarty: „Rezultatele arată clar că bacteriile obținute artificial prin acest procedeu, avînd capacitatea genetică de a degrada diferite carburi, pot crește mai bine și cu o viteză superioară pe petrolul brut cu atît mai mult cu cît celelalte procese de degradare controlate de către plasmidă o sporește în cantitate și în varietate". Se desprinde că în plasmidă există și alte gene prin care enzimele secretate ridică capacitatea de degradare. Înseamnă că este deschisă calea descoperirii unor supersușe ale căror plasmide controlează și alte procese de degradare. Și cercetătorul continuă: „Nu este nici un motiv să se creadă că singurele plasmide existente sînt doar cele care determină procesul de degradare a hidrocarburilor. Logic, trebuie să putem descoperi plasmide care produc enzimele necesare pentru degradarea celei mai mari părți a poluanților, cum sînt pesticidele, materialele plastice și alți compuși inerți".

Industria biologică. Microorganismele manipulate, „lacome" și „harnice", nu numai că vor resorbi mareele negre și vor degrada pesticidele și plasticele, scăpînd mediul înconjurător de poluanții sintetici industriali și menajeri, dar vor pune bazele unui nou tip de industrie, industria biologică. În uzinele biologice, aceste microorganisme, în special bacteriile *Pseudomonas* și *Escherichia* și altele asemenea lor, folosind materii prime ieftine cum sînt de exemplu substraturile carbonate sau lubrifianți uzați, vor putea produce proteine, suplimentînd proteinele vegetale și animale, în general, deficitare cantitativ.

Prepararea proteinelor din petrol nu este o problemă nouă. Ele au fost deja realizate și au și dat naștere ideii deosebit de atractive a „beefsteak-ului din petrol" („beefsteak" — cotlet de vită)... Proteinele produse din petrol conțin din nefericire unele substanțe aromatice care le depreciază calitatea. Acestea au limitat dezvoltarea industriei proteinelor din petrol. Se apreciază însă că prin combinarea procedeelor chimiei organice cu cele ale biotehnologiei s-ar putea obține o fracționare și rafinare a materiei prime care să asigure produsului final — proteinele, calități gustative și alimentare asemenea acelora ale proteinelor animale și vegetale.

Legitimarea noilor invenții de organisme vii va determina un avînt uriaș industriei chimice biologice. Prin folosirea ca materie primă a subproduselor agriculturii, a efluenților urbani și ai zootehniei, precum și a plantelor — lignocelulozice, alcooligene, acvatice, în general, a biomasei, se va putea obține energie reprezentînd zeci și sute de milioane de tone echivalent petrol (tep), etanol, metanol, metan, hidrogen, hidrocarburi, uleiuri, cauciuc ș.a. Microorganismele manipulate specializate pot realiza prin fermentația deșeurilor acestor bioindustrii produse cum sînt → acetonă, butanol, glicerol, acizi organici (citric, lactic, acetic etc.), produse aromatice, biopolimeri, biodetergenți.

Un rol încă neestimat pe deplin vor îndeplini microorganismele în extracția metalelor și a petrolului. După cum se știe, microorganismele includ în celulele lor numeroși compuși

organici susceptibili de a intra în reacție cu diverse metale: fier, magneziu, cupru, mangan, cobalt, molibden, zinc ș.a. Aceasta permite, prin selecția unor sușe specializate, să se realizeze concentrarea unora dintre metalele menționate chiar într-un substrat sărac. Astfel, folosirea thiobacililor pentru recuperarea cuprului din minerale puțin concentrate este o practică curentă. Bacteriile oxidează sulfurile în sulfați și mai departe în sulfat de cupru solubil, care este extras prin spălare. Metoda aceasta, puțin costisitoare, asigură, în S.U.A., extragerea a 5% din producția anuală de cupru. Microorganismele ar putea fi utilizate la extragerea din mediul marin a unor metale, printre care uraniu și aur. De asemenea, vor fi foarte utile în revitalizarea zăcămintelor sărace sau secătuite de petrol și în transformarea petrolului greu, vîscos, într-o formă lichidă exploatabilă. Se estimează că potențialul ingineriei genetice în domeniul energiei (în recuperarea petrolului) sau conversia în etanol a biomasei de către bacterii recombinate depășește cu mult suma de 25 miliarde dolari (pentru Genentech).

Microorganismele manipulate vor contribui la schimbarea din temelii a industriei farmaceutice. În locul substanțelor de sinteză sau produse potrivit tehnologiilor chimiei organice, se vor putea obține hormoni, substanțe de creștere, vitamine, antibiotice, secretate ca produse naturale. Este suficient să precizăm că prin biotehnologii se produce întreaga cantitate de vitamină B_{12} și parțial vitaminele B_2, C și A. La acestea se adaugă somatostatină, insulină, hormoni de creștere, proinsuline, timozină... și antibioticele cu o cifră de afaceri anuală de 30 miliarde dolari, interferonul la care mai puțin de 0,5 kg (o singură livră: 0,453 kg) costă 22 miliarde dolari, somatostatină cu 30 000 dolari gramul, de 150 ori mai mult decît aurul...

...Cifrele menționate sînt mai credibile decît orice propagandă sau reclamă în relevarea rolului și perspectivelor bioindustriei, bazată pe activitatea bacteriilor și enzimelor. Deci, în viitor, alături sau în locul uzinelor „monstruoase" de sinteză chimică, uzine cu tehnici mai „dulci", mai selective, de mare randament, nepoluante și silențioase, în care „mașinile" producătoare sînt microorganisme manipulate genetic.

Speranță legitimă: „industria genei" trebuie să devină prin colaborare internațională și munca constructivă a savanților de pretutindeni un bun pus în slujba întregii omeniri, al sănătății și bogăției pe întreaga planetă.

V

VIAȚA ÎN PERICOL...

Titlul acestui capitol ca și problematica abordată nu urmăresc nicidecum de a produce o reacție de teamă și pesimism. Se evidențiază faptul că progresul lumii contemporane și satisfacerea într-o mai mare măsură a cerințelor unei populații umane în plină creștere și urbanizare sînt strîns dependente de dezvoltarea industrială, bazată pe revoluția tehnico-științifică din ultimele decenii. Dar exploatarea intensă a resurselor solului și subsolului împreună cu extinderea industriei de mașini și prelucrătoare, precum și industrializarea creșterii plantelor și animalelor, a produs schimbări în raporturile dintre om și natură. Treptat, cu precădere în țările dezvoltate, habitatul uman (condițiile de mediu) se artificializează aglomerîndu-se cu combinate industriale și mașini, cu substanțe chimice de sinteză: detergenți, îngrășăminte chimice, pesticide, antioxidanți, coloranți, medicamente etc. cu substanțe plastice, cu deșeuri rezultate din activități industriale, agricole și menajere. Are loc astfel o modificare a mediului ambiant, care influențează negativ calitatea vieții și care poate periclita chiar structura genetică a substanței vii.

În acest context caracterizăm „agricultura tradițională" și cea „industrială" apărută mai ales în urma punerii la punct a chimiei complexe a îngrășămintelor anorganice și a pesticidelor. Acestea, dar și alte substanțe chimice și factori fizici care îndeplinesc un însemnat rol pozitiv, direct sau indirect în diverse activități umane, de la sporirea și apăra-

rea producției de alimente, la protejarea sănătății și chiar la pictură etc., prin efectele lor poluante, pot constitui în același timp agenți dăunători economic, biologic și genetic.

Desigur, în prezent și viitor, creșterea continuă a numărului populației Terrei, necesitatea acoperirii nevoilor de hrană ale omenirii — care este părtașa atîtor „crize" printre care și cea alimentară — impune găsirea unor metode eficiente pentru sporirea producției agricole. În aceste condiții o agricultură tradițională nu ar mai putea fi suficientă. În același timp, pentru păstrarea bunului cel mai de preț — pămîntul —, în condiții de fertilitate ridicată, nepoluat, sînt necesare transformări pentru ca agricultura să devină o agricultură „biologică", „organică". Pretutindeni în lume sînt adepți entuziaști ai agriculturii biologice, dar care doresc totuși să folosească la nevoie și îngrășăminte chimice obișnuite, sigur, control și în doze corespunzătoare, precum și pesticide cu remanență redusă sau nulă pentru combaterea buruienilor, a bolilor și dăunătorilor. Au apărut însă și adepți fanatici ai protejării mediului ambiant, care cer ca folosirea substanțelor chimice să fie interzisă definitiv în agricultură. Asemenea cerere rămîne însă în sfera dorințelor, deoarece agricultura exclusiv organică nu poate acoperi nevoile de hrană ale omenirii. Fără substanțe chimice — îngrășăminte, erbicide, insectofungicide, stimulatori etc. — agricultura este mai puțin productivă; cu productivitatea muncii redusă, omenirea s-ar vedea repede într-un proces de adîncire a lipsei de hrană. Din această cauză, chimizarea va juca în continuare un rol de mare însemnătate. Este însă important a menționa efectele negative ale chimizării excesive de care oamenii de știință, cultivatorii trebuie să țină seama. De fapt, ansamblul de cunoștințe din domeniul științelor agricole oferă nenumărate soluții pentru intensificarea producției vegetale și animale, inclusiv prin utilizarea unor substanțe chimice de sinteză, fără dăunarea critică a mediului natural[1].

---

[1] Bâlteanu Gh.: *Despre agricultura biologică*. În „Știință și tehnică" anul XXXIII, seria a II-a, nr. 8, București, 1982.

Acțiunile de viitor ale omenirii în sistemul productiv este necesar să fie corelate cu păstrarea echilibrului ecosistemului[1] și implicit cu protejarea vieții.

AGRICULTURA TRADIȚIONALĂ

Pînă în urmă cu două-trei decenii agricultura își baza tehnologiile în special pe exploatarea și păstrarea fertilității naturale și efective a solurilor. Extinderea terenurilor cultivate, folosirea intermitentă a suprafețelor existente în cultură („ogorul negru") și aplicarea îngrășămintelor organice erau elemente esențiale ale agriculturii tradiționale. Ele contribuiau la prezervarea sau îmbunătățirea cantităților de elemente nutritive din sol, precum și a însușirilor fizico-chimice, biologice și a regimului de apă din stratul arabil. Perfecționarea afînării solului, alcătuirea unor asolamente[2] științifice prin introducerea solei cu leguminoase și realizarea unei rotații raționale și economic avantajoase a contribuit la ajungerea la un nivel relativ ridicat al producțiilor la unitatea de suprafață (în 1980 de 2 — 3 ori mai mult decît în urmă cu 25 de ani). Utilizarea unor soiuri cu potențialități genetice tot mai bune a determinat de asemenea o creștere a productivității, iar structura obișnuit heterogenă a soiurilor sau populațiilor ameliorate cultivate asigura stabilitatea recoltelor.

În aceste condiții primele viețuitoare își luau energia și materialul de construcție din substanțele nutritive organice

[1] Ecosistem: sistemul ecologic unitar rezultat din interacțiunea totalității organismelor și condițiilor abiotice (temperatură, precipitații, vînt, sol, radiații naturale etc.).

[2] Asolamentul sau rotație: sistemul succesiunii plantelor cultivate pe terenul agricol al unei gospodării. Obișnuit, prima noțiune se referă la repartiția culturilor în spațiu pe tarlalele sau solele în care este împărțit terenul unei gospodării agricole, iar a doua noțiune se referă la succesiunea în timp, adică la numărul de ani după care culturile revin pe aceeași suprafață cultivată.

geochimice, nu prin ardere cu ajutorul oxigenului, ci prin fermentație, cel mai primitiv proces generator de energie pentru viețuitoare. Or, fermentația generează CO_2. Cînd în mediul de viață al viețuitoarelor inițiale acumulările de substanțe organice geochimice au fost epuizate, pentru supraviețuire, unele forme s-au adaptat evolutiv. Așa au apărut primele organisme capabile de fotosinteză.

Grație fotosintezei, gazul carbonic atmosferic este captat de plante și transformat în substanțe organice, în glucide. În fotosinteză are loc scindarea moleculei de apă în hidrogen utilizat în biosinteză și oxigen care este eliberat în atmosferă. Prin acest mecanism Pămîntul a dobîndit oxigen liber degajat din fotosinteză. Dar, toate organismele vii respiră, proces prin care ele preiau oxigen din atmosferă pentru combustiile lor (oxigenări) și degajă bioxid de carbon. După moartea organismelor, în Pămîntul primordial s-a depus o masă enormă de carbon organic, care, cu timpul, s-a transformat în hidrocarburi fosile. Descompunerea bioreducătoare a substanțelor organice conținute de organismele vii pune în libertate carbonul sub formă de bioxid de carbon (și apă).

S-a precizat că din totalul azotului de pe Pămînt, 80% se află în atmosferă sub formă de gaz inert din punct de vedere chimic. Din restul de 20%, o mare parte se găsește în humusul din sol, iar o altă parte însemnată se află în ființele vii, practic sub formă de compuși organici. Or, ciclul azotului constă tocmai în degradarea substanțelor azotate complexe, proteine și structuri proteice diverse, ce provin de la organismele vii. Această degradare dă naștere azotului gazos reemis în atmosferă sau azotului mineral utilizat de către plante.

Din cele două cicluri menționate decurg și ciclurile care implică fosforul, sulful, fierul și diverși cationi (calciu, potasiu, magneziu etc.), elemente implicate în substanța organică.

În sol, grație activității prodigioase a microorganismelor (bacterii, levuri, ciuperci inferioare ș.a.) toate substanțele organice, mai rapid sau mai lent, sînt descompuse. Deza-

gregarea conduce fie la molecule solubile în apă, fie la gaz care se întoarce în atmosferă. Toate aceste molecule sînt indispensabile vieții plantelor, animalelor, precum și microorganismelor. Apare clar faptul că fără sol și populațiile microbiene din el (într-un gram de sol se găsesc 1—2 miliarde bacterii, cîteva mii pînă la mai multe milioane de actinomicete și cîteva mii de ciuperci) viața pe Pămînt ar fi imposibilă.

Una dintre filierele de pătrundere a azotului în sol constă în descompunerea materiilor vegetale și animale. În agricultura tradițională, alături de subprodusele plantelor lăsate pe teren surse însemnate de azot erau îngrășămintele verzi (culturi speciale, de exemplu, mazăre, lupin) și gunoiul de grajd. Azotul molecular (N_2) din atmosferă poate pătrunde în sol și pe calea fixării de către bacterii și algele albastre. Unele dintre ele trăiesc libere (nesimbiotic) în sol. Așa sînt bacteriile aerobe: *Azotobacter vinelandii*, bacteria microaerofilică *Spirillium* și bacteriile anaerobe: nefotosintetice, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio*, *Methanobacterium* și *Klebsiella pneumoniae*, un organism strîns înrudit cu *Escherichia coli*. Algele albastre *Nostoc*, *Anabaena* etc. trăiesc de asemenea libere în sol și fixează N_2. Bacteriile din genul *Rhizobium* trăiesc în simbioză pe rădăcinile plantelor leguminoase. Aceste bacterii sînt incluse în nodozitățile de pe rădăcinile de mazăre, soia, fasole, trifoi, lucernă și alte leguminoase. Ele primesc de la planta simbiontă elemente nutritive, mai ales hidrocarbonate, iar în schimb fixează azotul din aer și permit plantelor să-l utilizeze. În simbioză cu feriga de apă trăiește alga albastră *Gunnera* care fixează N_2.

După pătrunderea în sol, o mare parte din azot este încorporat în humus (humusul conține în medie 2,5 — 4% azot, 45 — 60% carbon, 34 — 45% oxigen, 0,3 — 5,5% hidrogen și mai puțin de 1% substanțe minerale). Sub acțiunea microorganismelor din sol: bacterii, alge, ciuperci, humusul degajă lent azot, prin mineralizare, sub formă de amoniac (NH_3). Sub influența bacteriilor aerobe din genul *Nitrosomonas* se petrece fenomenul de nitrificare, care constă în oxidarea amoniacului în nitriți (NO_2). Apoi bacteriile din genul *Nitrobacter* oxidează nitriții în nitrați (NO_3). Nitrații sînt preluați de rădăcinile plantelor și transformați în proteine și în alte substanțe vitale pentru lumea vegetală. O parte din ionii de nitrați pot fi reduși de bacterii denitrificatoare cu formarea de azot gazos, eliberat în atmosferă.

Acesta este ciclul azotului, care împreună cu cel al carbonului asigură creșterea plantelor și echilibrul naturii.

Pînă la răspîndirea îngrășămintelor anorganice cu azot, agricultura conta masiv tocmai pe aportul microorganismelor fixatoare de azot, pentru a menține fertilitatea solului. În asolamentul practicat, de 4 — 6 ani, una dintre culturi era o leguminoasă (mazăre, trifoi, fasole, soia). Trăind în simbioză cu planta leguminoasă sau în rizosferă, bacteriile fixatoare de azot îmbogățesc solul cu aproximativ 100 kg azot la hectar într-un an (între 80 și 450 kg/ha/an experimental, la soia, cu adăugarea CO_2 de la 0,03 pînă la 0,1%, în atmosfera din jurul frunzei[1]. Plantele leguminoase perene, trifoiul și lucerna, adaugă solului circa 150 — 200 kg/ha/an de azot), compensînd azotul preluat de culturi s-au pierdut în aer. În acest fel prin includerea în asolament a unei leguminoase se subordonează interesului omului, pe gratis, forța enormă naturală a bacteriilor. Produsele acestora, azotul organic este folosit apoi de plantele nefixatoare de azot: cereale, floarea-soarelui ș.a.(De exemplu, o recoltă de grîu de 2 500 — 3 000 kg/ha, împreună cu paiele și rădăcinile care rămîn în sol, înglobează împreună 78—80 kg azot la hectar).

Revenind la humus, reamintim că el degajă cu greu nitrații. De altfel, din întreg ciclul azotului această fază este cea mai lentă. Explicația trebuie căutată în faptul că însăși elaborarea fracției organice a solului este un proces lent și continuu, solul fiind un țesut complex și echilibrat. El cedează substanțe pe măsura reînnoirii acestora. În acest sens trebuie precizat că humusul este alcătuit din două părți: amestecul de resturi vegetale netransformate și substanțele în curs de degradare (care, de fapt, constituie humusul), ce reprezintă o rezervă unică de elemente biogene la dispoziția organismelor din sol. Tocmai datorită eliberării lor lente, în apa din sol, concentrația naturală de nitrați este foarte mică. Ca urmare, rădăcinile plantelor depun efort pentru a-i absorbi. Pentru acest efort, plantele consumă energie, pro-

---

[1] Hardy, R.W.F., În „Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation: Interdisciplinary Discussions". W.E. Newton and C.Y. Nyman eds., Washington State Univ. Press, 1974.

venită din procesele de oxidare biologică ce au loc în rădăcini. Oxigenul ajunge din aer, în cazul în care solul este suficient de poros (cînd conține aproximativ 25 % aer și tot 25 % apă). Porozitatea solului depinde foarte mult de conținutul de humus, datorită faptului că acesta are o structură spongioasă. Astfel, porozitatea solului și, deci, și conținutul de oxigen și apă al lui, precum și eficiența absorbției substanțelor nutritive de către rădăcinile plantelor sînt în strînsă legătură cu humusul din sol. Printr-o creștere activă, plantele convertesc hrana anorganică în substanță organică vegetală, care, putrezind în sol, mărește conținutul de humus, sporind astfel porozitatea solului și, în consecință, ajutînd plantele să crească eficient.

Privite în ansamblu, cele descrise pot fi reunite în două grupuri de relații: unul referitor la mișcarea generală a atomilor de azot prin ciclul solului, celălalt privind relația reciprocă dintre creșterea eficientă a plantelor și structura solului. Ambele grupuri de relații au un element esențial comun: humusul. În unul din cicluri, humusul constituie rezerva principală de azot din sol pentru creșterea plantelor, în celălalt el asigură acea stare fizică a solului care permite plantelor să folosească eficient substanțele nutritive, inclusiv azotul degajat din humus. Legătura dintre cele două proprietăți sau roluri ale humusului în sol este atît de intimă încît orice modificare cantitativă sau calitativă este reflectată de starea solului. De exemplu, scăderea conținutului de humus din sol atrage după ea o reducere a cantității de nitrați disponibilă pentru creșterea plantelor. În același timp scade și eficiența absorbției nitraților de către rădăcini. Din contră, cînd solul are un conținut normal sau ridicat de humus are loc nu numai o bună nutriție cu azot, dar și folosirea economicoasă a acestuia în plante. Deci, efectul humusului asupra creșterii plantelor este deosebit de complex.

Trebuie menționat că, datorită echilibrului dintre intensitatea descompunerii substanțelor organice și gradului de utilizare a acestora de către plante și în ciclul solului, în apa freatică, practic, nu ajung nitrați din sol. După cum subliniază B. Commoner[1], conținutul de nitrați al apelor naturale

---

[1] Commoner B., *Cercul care se închide*, Editura Politică, București, 1980.

de suprafață este foarte mic, de ordinul unei părți la un milion (1 ppm), populația de alge este puțin numeroasă (în prezența nitraților algele se înmulțesc, ele reconvertesc nitrații în forme organice). În consecință apa este limpede și, în mare măsură, lipsită de deșeuri organice nocive.

În agricultura tradițională (din zonele cu climat temperat), fertilitatea solului se menținea și sporea, obișnuit, prin încorporarea resturilor vegetale (circa 2t/ha rădăcini și substanță uscată, s.u., la grîu, 4t/ha s.u rădăcini de trifoi etc., plus 2—5t/ha paie, vreji, coceni și alte deșeuri vegetale), a îngrășămintelor organice și datorită activității microorganismelor. Solul, ca organism viu, era sensibil la schimbările sezoniere și la tratamentele fizice produse de uneltele agricole. Aceste schimbări nu produc însă îmbolnăvirea sau deteriorarea solului.

Pînă în urmă cu 2 — 3 decenii soiurile folosite în cultură erau, în general, alcătuite din mai multe genotipuri (asemănătoare, sau foarte asemănătoare morfologic). Aceste soiuri asigurau producții relativ mari, de calitate bună și economic rentabile. Faptul că aceste soiuri reprezentau, de fapt, populații de genotipuri, a făcut ca ele să nu constituie un mediu propice pentru dezvoltarea unor boli sau dăunători specializați. Cu excepția unor epidemii grave, întîmplătoare, cum a fost atacul de mana cartofului (care a distrus această plantă, în Irlanda, în 1840), de atacul manei-viței de vie (după 1878, în Franța) și filoxeră (după 1884, în România) ș.a. cele mai intense atacuri distrugeau recolta în proporție de aproximativ 70—80 %.

Prevenirea atacului bolilor și al unor dăunători era realizată prin aplicarea unor măsuri agrotehnice eficiente (în special rotația culturilor ș.a.) și de igienă culturală. În România doar două boli erau combătute sistematic: mana viței de vie, prin stropiri cu zeamă bordoleză și mălura comună a grîului, prin tratarea semințelor înainte de semănat cu produse chimice antimălurice. Atacul filoxerei era prevenit prin altoirea viței nobile europene pe portaltoi de origine americană. Este adevărat faptul că plantațiile de pomi, în general, nu erau organizate în masive, și, practic, nu existau sere, iar irigarea culturilor era foarte limitată. De asemenea, țara nu era infestată cu unele insecte cum este gîndacul

din Colorado, iar altele erau încă relativ puțin răspîndite (păduchele din San José al pomilor fructiferi) etc.

Soiurile și populațiile locale cultivate pe lîngă capacitate de producție și rezistență generală la condițiile de mediu erau înzestrate și cu o bună calitate a producției. Este știut faptul că faima grînelor românești s-a bazat în primul rînd pe aceste două proprietăți: rezistența la factorii de mediu excesivi și o calitate superioară. Pentru cele două importante proprietăți soiurile vechi sînt păstrate în colecții și în „bănci de gene", fiind utilizate în programele de ameliorare ca surse valoroase de gene.

În general, agricultura tradițională folosea în mică măsură cuceririle științei și tehnicii. Într-o lume aflată în ajunul industrializării, la începutul expansiunii demografice, agricultura abia încerca efectele mecanizării, irigării și a substanțelor minerale și organice de sinteză (îngrășăminte chimice, pesticide etc.). Într-o agricultură extensivă, în producția agricolă nu se urmărea profitul maxim și, ca urmare, nu se efectua nici modificarea sensibilă a metodelor de cultură.

Edificatoare sînt datele înscrise în Anuarul Statistic al R.S.R.: în 1938 (an de referință în analiza comparativă a datelor) au fost realizate producții record pentru perioada dinaintea ultimei conflagrații mondiale. Din analiza datelor rezultă că față de 1938, pînă către anul 1960, cu toate că forma organizatorică s-a schimbat profund, în ansamblu, producțiile medii la hectar nu s-au schimbat radical (cu unele excepții) deoarece pînă în 1960, în agricultură se făcuseră încă puține dotări, cu tractoare (circa 44 000 tractoare fizice) și mașini, cu îngrășăminte chimice (74 500 tone) și soiuri ameliorate (cu unele excepții se cultivau vechile soiuri).

Din cele prezentate se poate desprinde un fapt esențial și anume că agricultura, pînă către anii '60, realiza o producție vegetală mai „igienică" (este adevărat, de 2 — 3 ori mai mică comparativ cu producția realizată la hectar în 1979). În cultura plantelor nu se utilizau produse chimice de sinteză (îngrășăminte și pesticide) și irigarea. Ca urmare, mediul de cultură și, în special, solul nu au fost supuse efectelor substan-

țelor nemetabolizabile și nici degradării sau distrugerii texturii și salinizărilor secundare.

Pe glob, în prezent, fără a se greși, aprecierea de „agricultură ecologică" îmbinată cu elemente de modernism poate fi raportată, printre alte țări, la R.P. Chineză. În această țară (cu 933,03 milioane locuitori, în 1978) folosirea rațională a tradițiilor și reconsiderarea acestora în lumina cunoștințelor științifice acumulate în ultimii treizeci de ani, în lipsa posibilităților de utilizare a îngrășămintelor anorganice de sinteză, dar printr-o organizare și activitate exemplară, s-a reușit totuși să fie continuu sporită producția agricolă. De exemplu, pînă în 1975, producția medie de cereale a atins nivelul înalt de 1 800 kg/ha. Producția de grîu și porumb realizată în 1978 în R.P. Chineză a reprezentat 9,75% din producția mondială, cu o medie de 14,0q/ha și respectiv, 30,0q/ha.

Parafrazîndu-l pe B. Commoner, înseamnă că agricultura, anterioară aplicării tehnicii moderne, reprezenta activitatea umană cea mai apropiată de natură. Ferma nu era decît un loc unde, servind interesele omului, se desfășurau cîteva activități biologice cu totul naturale: cultivarea plantelor în sol și creșterea animalelor cu ajutorul produselor recoltate. Între aceste două laturi existau relații reciproce, de asemenea naturale: plantele extrăgeau din sol substanțe nutritive, de pildă azot anorganic; substanțele nutritive erau create, prin acțiunea treptată a bacteriilor, din rezerva de materie organică din sol; această rezervă organică era menținută prin revenirea în sol a resturilor vegetale și a deșeurilor animale și prin fixarea azotului din aer într-o formă utilă, organică.

În aceste condiții, ciclurile naturale (ale solului, azotului, carbonului etc.) sînt aproape în echilibru și, cu puțină grijă, se poate menține fertilitatea naturală a solului, așa cum se întîmplă de secole întregi în unele regiuni (de exemplu, în țările vest-europene). Deosebit de importantă este păstrarea în sol a îngrășămîntului natural, ca și folosirea în același scop a fiecărei fărîme de substanță vegetală, incluzînd aici și revenirea în sol a deșeurilor produse în orașe prin consumul hranei provenită de la ferme.

Cauze şi efecte

În anii '50 populaţia globului a sporit cu 0,5 miliarde oameni (în 1950, populaţia globului a fost de 2,2 miliarde, în prezent a ajuns la 4,5 miliarde). Concomitent a avut loc o industrializare intensă în numeroase ţări. Consecinţa directă: creşterea puternică a populaţiei ocupată în industrie şi reducerea populaţiei ocupată în agricultură. Progresul tehnic poate fi socotit o cauză şi un efect al dezvoltării rapide a ştiinţei.

Urbanizarea explozivă datorată industrializării a ridicat cu acuitate problema alimentării cu pîine şi produse animaliere a marilor concentrări umane. În faţa cererilor, reacţia planificatorilor agriculturii a fost promptă: extinderea masivă a suprafeţelor cultivate cu cereale şi creşterea animalelor în padocuri. Cum şi cererile de zahăr, ulei, cartofi creşteau şi plantele tehnice au fost extinse. În dauna cui să fie crescute suprafeţele de grîu, porumb (pentru furajarea animalelor) şi plante tehnice? Soluţie simplă! În dauna rotaţiei şi a leguminoaselor. În general, renunţarea la rotaţie a făcut ca grîul, porumbul, orzul să se succeadă mai des, pe alocuri s-a trecut chiar la monocultură (grîu după grîu sau porumb după porumb). Reducerea suprafeţelor cu leguminoase, a căror aport direct la hrană nu se sesiza, s-a făcut deoarece ele produceau proteine şi azot, componenţi alimentari încă neapreciaţi.

Aşadar, în cultura agricolă actuală, pretutindeni pe glob, în goana după grîu şi porumb se poate distruge în multe cazuri echilibrul ecosistemului sol, care nemaibeneficiind de asolamentul cu leguminoase şi de îngrăşămîntul natural a început să se deterioreze, devenind tot mai sărac în azot. Într-adevăr, cînd solul este intens cultivat, iar recolta este culeasă şi nu mai revine în sol sub forma gunoiului de grajd, cantitatea de azot din humus scade din ce în ce. Ca urmare, în special producţia cerealelor, mari consumatoare de azot (sfecla, cartoful, floarea-soarelui consumă mult potasiu; leguminoasele consumă cantităţi mari de calciu), risca să scadă drastic. Deci, se impunea înlăturarea factorului limitativ al producţiei vegetale, lipsa de azot.

Reducerea sau eliminarea asolamentului şi rotaţiei, cu precădere monocultura, precum şi introducerea în cultură a unor soiuri tot mai uniforme genetic (puţine genotipuri homozigote sau chiar linii pure, la speciile autogame şi hibrizi F_1 între linii consangvinizate la plantele alogame) a invitat la înmulţire speciile de boli, dăunătorii şi buruienile. S-au dezvoltat rase fiziologice patogene complementare genotipurilor din cultură. A apărut astfel un fenomen grav: vulnerabilitatea genetică a soiurilor şi hibrizilor cultivaţi faţă de atacul specializat al patogenilor.

Lipsa de azot din sol şi pierderile tot mai mari de recoltă datorită atacului patogenilor şi buruienilor sînt factorii condiţionanţi ai dezvoltării puternice a industriei chimice a îngrăşămintelor anorganice, în special cu azot şi a pesticidelor (fungicide, insecticide, erbicide).

În lume, faţă de 2—3 milioane tone îngrăşăminte chimice în anii '50, în 1965 se fabricau deja 47 milioane tone, în 1970, 73 milioane tone, iar în 1980, aproximativ 120 milioane tone. În primii 15 ani o creştere a cantităţilor de îngrăşăminte chimice între 1 566—2 350%, iar în încă 15 ani (pînă în 1980) cu 4 000—6 000%. În S.U.A., între 1946 şi 1972, producţia de azot în îngrăşăminte a crescut cu 1 050%, iar a pesticidelor cu 390%.

În România, cantitatea de îngrăşăminte anorganice (substanţă activă) folosită în agricultură a fost neînsemnată în 1950 (de numai 5 900 tone). După 10 ani, în 1960, cantitatea aplicată de îngrăşăminte chimice a crescut la 74 500 tone, în 1970 la aproape 600 000 tone, iar în 1979, la 1 217 000 tone. Raportarea cantităţii totale de îngrăşăminte chimice la totalul terenului arabil evidenţiază că s-au aplicat, în 1970, 61 kg/ha substanţă activă (s.a.) iar în 1979, 123 kg/ha substanţă activă. În întreprinderile agricole de stat, în aceiaşi ani, pe terenul arabil s-au aplicat 123 kg/ha, respectiv, 191 kg/ha substanţă activă. Între 1950 şi 1979 cantitatea de antidăunători, fabricată în România, a crescut de 85 ori.

Alături de organizarea socialistă a agriculturii şi de numeroşii specialişti cu înaltă calificare, în arsenalul de mij-

loace care au contribuit masiv la sporirea producției agricole în România, după 1960, la aplicarea în cantități crescînde a îngrășămintelor chimice și antidăunătorilor este necesar să adăugăm un număr mare de tractoare (în 1960, 222 hectare pe un tractor fizic, în 1979, 70 ha/tractor fizic) și numeroase mașini cu randamente sporite. De asemenea trebuie semnalată suprafața amenajată pentru irigat: de la aproape 200 000 ha în 1960 s-a ajuns la peste 2 250 000 ha în 1979. Începînd cu anii '60 genotipurile vechi cultivate, practic, au fost înlocuite cu soiuri și hibrizi F_1 nou creați, introduși sau realizați în țară, cu capacitate de producție și adaptabilitate superioare.

În aceste condiții producțiile vegetale în țara noastră au crescut sensibil. Față de 1960, an de referință pentru începutul chimizării, în 1970, respectiv 1979, producția medie la hectar a crescut la grîu cu 19,0%, respectiv cu 81,8%, la porumb cu 36,7%, respectiv cu 140,0%, la floarea-soarelui cu 18,6%, respectiv, cu 59,8%, la sfecla de zahăr cu 9,8%, respectiv cu 50,8%, la cartofi în 1979, cu 47,0% etc. Deci, la cele 5 specii principale cultivate, care ocupau, în 1979, 66,4% din suprafața arabilă a țării, sub influența modernizării agriculturii, în primul rînd prin chimizarea și folosirea unor soiuri cu potențialități genetice ridicate, s-a realizat față de 1960 o creștere a producției medii la hectar cuprinsă între 147,0% (la cartof) și 240,0% (la porumb).

Cerealele ocupă anual 64,4% (în 1979) din suprafața arabilă, cealaltă suprafață arabilă (35,6%) este însămînțată cu plante tehnice, leguminoase etc. Înseamnă că mai mult de jumătate dintre cereale urmează obligatoriu după cereale, frecvent grîu după grîu, sau porumb după porumb, iar în anii normali și grîu după porumb. Aproximativ 90% din suprafața cultivată depinde practic de substanțele chimice de sinteză (îngrășăminte cu azot și fosfor și pesticide). Pentru realizarea recoltelor, acestea trebuie aplicate obligatoriu și cu regularitate, fără greș, ținîndu-se seama în mod strict de recomandările specialiștilor. Orice dereglare diminuează sensibil recolta.

Însușirile fizice, chimice și biologice ale solului sînt puternic influențate de plantele cultivate și mai ales de tehnologia aplicată.

O stare fizică bună și condiții de creștere normale pentru plante au solurile în care proporția agregatelor hidrostabile, cu diametrul mai mare de 0,25 mm, depășește 50%. Agregatele sînt sfărîmate de acțiunea mecanică a picăturilor de ploaie, iar cînd nu se lucrează cu atenție, chiar de cea a apei de irigație prin aspersiune și de presiunea tractoarelor, a mașinilor agricole, a camioanelor. În solul cultivat cu cereale, dar mai ales cu plante prășitoare, are loc reducerea sensibilă a agregatelor hidrostabile (la 25 — 20% și mai puțin). Din această cauză solul se tasează devenind impropriu creșterii și respirației rădăcinilor, precum și activității microorganismelor din sol.

Toată lumea cunoaște însemnatele beneficii ale irigării asupra creșterii producției agricole. Așa se explică eforturile uriașe pe care statul nostru le face în această direcție. Dar, trebuie știut că beneficiile se obțin doar la o irigare aplicată rațional și științific. Irigarea nerațională aduce după sine înrăutățirea pronunțată sau chiar distrugerea însușirilor solului. De exemplu, la Valu lui Traian, în Dobrogea (cum precizează dr. Simota și colaboratorii, 1975), după 5 ani de irigare, pe stratul de sol de la 0 — 40 cm adîncime, greutatea volumetrică a crescut cu 9%, permeabilitatea a scăzut cu 81%, capacitatea pentru apă în cîmp cu 17%, pH-ul a scăzut cu 13%, conținutul în humus s-a micșorat cu 14%, fosforul mobil cu 68%, iar potasiul mobil cu 9%. Deci, o degradare pe toate planurile: reducerea proporției agregatelor hidrostabile, acidifierea, reducerea humusului și a elementelor nutritive. Pericolul imediat rezultă din reducerea pînă la o limită critică a permeabilității. Înseamnă că dacă nu se iau măsuri corespunzătoare, în curînd, într-un asemenea sol, apa de precipitații sau de irigații nu va mai pătrunde, ci va bălti la suprafață, iar plantele nu vor mai crește, solul devenind practic impropriu culturii plantelor.

Cît de mult pot creşte recoltele?

Utilizarea îngrăşămintelor anorganice cu azot a determinat un „boom" pentru producţia vegetală. Au crescut producţiile şi productivitatea muncii agricole, au crescut veniturile, s-au satisfăcut multe din cererile de alimente.

Productivitatea pămîntului poate fi sporită considerabil prin aplicarea îngrăşămintelor artificiale cu azot. Iniţial, creşterea dozelor aplicate a asigurat o sporire corespunzătoare a producţiilor. Paralelismul dintre creşterea dozelor de îngrăşăminte chimice şi creşterea producţiei vegetale apărea ca un proces normal.

Din analiza creşterii producţiilor agricole în ţara noastră, de asemenea, rezultă că îngrăşămintele chimice au îmbunătăţit substanţial producţiile medii la hectar. Din 1960 pînă în 1979 creşterile reprezintă 181,8% la grîu, 240,0% la porumb, 159,8% la floarea-soarelui, 150,8% la sfecla de zahăr etc. Să precizăm că între 1960 şi 1979, dozele folosite de îngrăşăminte chimice în substanţă activă au crescut de la 7,5 kg/ha (61,0 kg/ha, în 1970) la 123 kg la hectarul de teren arabil. În realitate cantităţile de îngrăşăminte chimice trebuie raportate la suprafaţa agricolă (arabil + vii + livezi + păşuni + fîneţe; 14 900 000 ha). În acest caz revin 5,1 kg/ha în 1960, 39,8 kg/ha în 1970 şi 81,3 kg/ha substanţă activă, în 1979.

În acest context, principalelor culturi agricole le revin în anii 1960, 1970 şi 1979 următoarele cantităţi de îngrăşăminte chimice în substanţă activă (date stabilite de profesorii Velicica şi David Davidescu) la grîu şi porumb: 5, respectiv 42, respectiv 85 kg/ha, la sfecla de zahăr: 3,0, 18, respectiv 120, la floarea-soarelui: 0,18, respectiv 30 kg/ha. Aceste cantităţi par rezonabile.

Potrivit unor date ale F.A.O., producţia agricolă la unitatea de suprafaţă exprimată valoric a fost mai mare în Belgia, Olanda şi Japonia, cu un consum mediu de 400—500 kg/ha îngrăşăminte chimice.

Să urmărim spre exemplificare ce se întîmplă cînd cresc cantităţile de îngrăşăminte cu azot peste limitele raţionale. Să folosim în acest scop datele lui B. Commoner obţinute în statul Illinois, din S.U.A.

Specificaţie	1945—48	1958	1965
Îngrăşăminte administrate, tone	—	100 000	400 000
Spor %		100	400
Producţia în busheli[1]/acru[2]	50	70	95
Spor %	100	140	190
Spor %		100	135

[1] 1 acru = 0,4 ha
[2] 1 bushel = 35,24 l

Sporul de producţie prin folosirea îngrăşămintelor este evident. La 100 000 t azot producţia medie/acru a crescut la 140%, iar la adăugarea a încă 300 000 t producţia medie a ajuns la 190% faţă de terenul neîngrăşat. Este de reţinut faptul că la primele 100 000 t producţia a sporit cu 20 busheli/acru, apoi ca să se mai realizeze un alt spor de 25 busheli/acru a trebuit să se administreze nu numai 125 000 t, ci 300 000 t. Înseamnă că eficienţa îngrăşămintelor cu azot asupra creşterii producţiei este mare la cantităţi moderate, apoi scade o dată cu creşterea dozelor. Situaţia relevă manifestarea *legii randamentelor descrescînde*[1]. Potrivit acesteia fiecare intervenţie succesivă şi echivalentă (a doua doză de îngrăşămînt) are totdeauna un efect mai mic decît intervenţia precedentă (prima doză), dar mai mare decît intervenţia următoare, succesivă şi echivalentă (a treia doză).

Manifestarea acestei legi poate să fie întîrziată în cazul cînd se folosesc soiuri şi hibrizi cu potenţial de folosire a îngrăşămintelor chimice mereu mai mare. La soiurile îmbunătăţite continuu în privinţa capacităţii de bioconversie energetică a îngrăşămintelor, în vederea asigurării creşterii producţiilor, este necesar ca sporirea dozelor de macroelemente (N, P, K, precum şi Ca, Mg, S) şi microelemente

[1] Davidescu D. şi V. Davidescu, *Agrochimia modernă*, Edit. Academiei R.S.R., Bucureşti, 1981.

(Fe, Mn, B, Cu, Zn) să fie asociată cu o prelucrare calitativă a solului, în condiții favorabile ale factorilor climatici (lumină, apă, temperatură).

„Boala albastră" indusă de concentrația mare de nitrați din apa de băut

Ce se întîmplă oare cu azotul administrat solului, dar neabsorbit de plantele de cultură? Inițial, soarta acestui azot pierdut nu a interesat pe nimeni. În S.U.A., unde fenomenul a fost observat, prețul îngrășămintelor era foarte scăzut. Pe fermieri îi interesa producția care sporea concomitent cu creșterea dozei de azot administrat, în special, la porumb. Prosperau atît companiile producătoare de azotați, cît și fermierii (pentru care producția minimă rentabilă era de peste 80 busheli/acru sau 2 819 kg/ha).

Cum s-a menționat, în solurile bogate în humus, azotul organic mobilizat de unele bacterii la nivelul rădăcinilor este eliberat lent. Administrarea îngrășămintelor chimice, obișnuit, duce la intensificarea descompunerii substanțelor organice din sol (de exemplu, în Franța, în regiunile neindustrializate Beauce și Brie, cu culturi intensive de grîu, solul a sărăcit în substanță organică de la un conținut de 3,6% în 1930, la 1,7% în 1960. Pe aceste soluri au fost administrate cantități din ce în ce mai mari de îngrășăminte cu azot). În plus, azotul din îngrășămintele chimice este deosebit de mobil. Astfel, dacă ne referim la formele de azot anorganic folosite de către plante, amoniul (NH_4^+), nitriții (NO_2^-) și nitriții (NO_3^-), ele sînt forme ionice care se găsesc în soluția solului.

Procesul de formare a azotului mineral constă în amonificare și nitrificare. Oxidarea amoniului în nitriți este realizată de bacteriile *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosoglea* ș.a., iar a nitriților în nitrați de *Nitrobacter*, *Nitrocystis* ș.a. (denitrificarea este realizată de *Pseudomonas pyocyanea*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* ș.a. care reduc nitrații în nitriți, de *Bacillus subtilis* și *Clostridium sporogenes*, care reduc nitriții în amoniac și de *Bacillus denitrificans*, *B. nitroxus* ș.a. care duce procesul pînă la N_2).

Nitrații și nitriții sînt săruri solubile ce disociază ușor și se găsesc în soluția solului exclusiv sub formă de ioni difuzabili (din amoniu doar o mică parte se găsește sub formă ionică). Or, această stare, sub influența unor factori din mediu, determină mineralizare, imobilizare și denitrificare (factorii biologici), mișcarea compușilor minerali ai azotului spre suprafață sau adîncime (factorii fizici) și volatilizări de NH_3 (amoniac) și N_2. În zone cu climat umed (sau în condiții de irigare), ca efect al acestor factori are loc creșterea mineralizării azotului, primăvara și la începutul verii și a levigării în timpul iernii.

În timp ce consumul mediu de azot la cerealele neirigate este cuprins între 50—100 kg/ha, la plantele tehnice irigate este de 150—250 kg/ha. Concomitent, la un hectar pierderile de azot sînt de 10 kg/ha sub ierburi, 80 kg/ha sub vița de vie și peste 160 kg/ha sub un sol arat, dar necultivat. Erodarea solului determină de asemenea pierderi în conținutul de azot (pînă la 27 kg/ha, în medie, la solurile cultivate din S.U.A.). Din azotul îngrășămîntului (sulfat de amoniu) administrat în doze de 100 și 250 kg/ha, porumbul a folosit o cantitate reprezentînd 39%, respectiv 32%. După unele date[1], din îngrășămintele cu azot marcat ^{15}N, pe diferite soluri, plantele utilizează, în primul an, în medie, 47% (între 32—54%), iar în anul al doilea, în medie, 2,3%. Restul azotului se pierde.

Așadar acea parte a azotului din sol, care nu este utilizată de plante, fie că provine din mineralizarea azotului organic din humus, fie din îngrășămintele cu azot anorganic, se pierde prin levigare (circa 10%), prin scurgeri de suprafață și eroziune (circa 9,3%) și denitrificare (circa 18% din îngrășămintele aplicate). O parte din pierderi (prin levigare și scurgere) poate ajunge în apa freatică și de acolo în fîntîni, izvoare, rîuri, existînd astfel riscul „infestării" apelor mai ales cu nitrați (99% nitrați, 1% amoniu și nitriți. Dar apa de băut otrăvită cu nitrații produce modificări patologice organice sau funcționale la om și anume formarea de methemoglobină-MetHb, în sînge.

Hemoglobina, pigmentul roșu al eritrocitelor la vertebrate, asigură transportul gazelor: O_2 și CO_2, prin sînge. Ea

[1] Davidescu D. și colab., *Azotul în agricultură*, Edit. Academiei Republicii Socialiste România, București, 1976.

este o cromoproteină alcătuită din hem (gruparea prostetică) reprezentată de o proteină conjugată cu fier-Fe, de culoare roșie și o proteină — globina. O moleculă de hemoglobină este formată din patru unități hem și patru lanțuri polipetidice. Un nucleu de hem legat de un lanț polipeptidic formează un monomer (deci, molecula de hemoglobină este un tetramer). Globina este singura proteină care permite combinarea labilă a hemoglobinei — Hb cu O_2. De fapt fiecare atom de Fe fixează o moleculă de oxigen. Ca urmare, molecula de Hb avînd o structură tetramerică cu patru nuclei de hem (cu 4 atomi de Fe) va fixa patru molecule de O_2 (Hb_4O_8).

Hemoglobina are proprietatea de a forma cu O_2 o combinație labilă numită oxihemoglobină (O_2Hb). Fixarea oxigenului pe hemoglobină este un proces labil și reversibil de oxigenare (fierul rămîne bivalent — Fe^{2+}, feros) și nu de oxidare (cînd fierul se transformă în trivalent — Fe^{3+}, feric, cum se află în alimente). Oxigenul se fixează pe Hb la o presiune ridicată a O_2 (în plămîni), iar la o presiune scăzută (în țesuturi) Hb cedează oxigenul după reacția reversibilă: $Hb + O_2 \rightleftarrows O_2Hb$. Legătura labilă a Hb cu O_2 se datorează atît fierului (Fe^{2+}), cît și globinei. (Pentru fixarea oxigenului una din legăturile coordinative dintre fier și azotul ciclului imidazolic al histidinei din globină se desface reformîndu-se cu oxigenul atmosferic. Ia naștere astfel o hemoglobină).

În condiții anormale, cînd hemoglobina nu mai este oxigenată, ci oxidată, în contact cu un oxidant puternic (de exemplu, cu fericianură de potasiu) rezultă methemoglobină, în care globina rămîne intactă, nealterată, în schimb grupul prostetic se oxidează transformîndu-se din hem în hemină, în care fierul este trivalent (feric) și formează cu O_2 o combinație stabilă. Înseamnă că methemoglobina reprezintă un derivat al hemoglobinei în care complexul porfirinic feros este convertit în formă ferică. În această formă nu se combină cu oxigenul, deci methemoglobina este inutilizabilă pentru respirație.

Cînd nitriții și nitrații se află în apa fîntînilor, a rîurilor ș.a., peste limitele admisibile, sînt oxidanți puternici, avînd acțiune methemoglobinizantă. Sîngele methemoglobinicilor are culoare „brună" („cianoză"-colorație albastru-violacee a pielii și mucoaselor de unde denumirea de „boală albastră" datorită prezenței methemoglobinei în sînge într-o proporție de peste 2—3%. Peste 30—40% apar dureri de cap, somnolență, amețeli. Cînd toxicul din organism are valori mari, methemoglobina poate ajunge la peste 50%, producînd anemii hemolitice; la peste 60—70% MetHb omul moare. Această boală este mai frecventă la sugari și copii, cărora li se prepară alimentele cu apă de fîntînă cu conținut crescut de nitrați (care se transformă în nitriți sub acțiunea florei intestinale inclusiv a bacteriei *Escherichia coli*).

Se consideră că nitratul (NO_3) ca atare nu ar produce intoxicarea. El devine toxic prin transformarea în nitrit (NO_2). Procesul are loc în tubul digestiv sub acțiunea florei intestinale. Deoarece activitatea florei denitrificatoare este mai activă la copii, incidența formării methemoglobinei este mai mare tocmai la aceștia. În plus, copiii sînt expuși pericolului intoxicării cu nitriți, deoarece ei nu se deplasează asemenea adulților, ci rămîn permanent într-un anumit loc (curte), fiind dependenți de aceeași sursă (fîntînă) de apă.

Trebuie adăugat și faptul că folosirea unor doze de îngrășăminte chimice cu azot la speciile furajere și la unele legume (spanac, varză, salată) duce la acumularea ionului nitric în plante. Consumul, în stare proaspătă a acestor plante, de către oameni și animale provoacă intoxicații grave.

La începutul acestui paragraf am relevat că pierderea îngrășămintelor cu azot a fost sesizată în S.U.A. Faptul că nitrații ajung în apele freatice a fost descoperit tot în S.U.A., la început în statul Illinois, în a căror ape potabile nivelul nitraților a atins, către anul 1965, cote periculoase, peste 45 ppm (părți pe un milion sau miligrame la litru).

Folosirea unor analize fine (azotul ^{14}N și ^{15}N și spectrometrul de masă) a relevat că cel puțin 60% din nitrații care poluează apele freatice provin din îngrășămintele chimice cu azot (restul provin din oxizii de azot, eliminați în atmosferă de diverse industrii, din gunoaie menajere, din substanțele organice din sol). Creșterea conținutului de azotați din apele freatice și asocierea ei cu o incidență mai mare a cazurilor de methemoglobinemie evidențiază riscul reprezentat de utilizarea unor cantități mari de îngrășăminte cu azot. Astfel, s-a stabilit că în unele districte ale statului Illinois, morta-

litatea infantilă la fetițele născute în aprilie, mai și iunie, cînd nivelul nitraților este ridicat, a fost de 5,5‰, în comparație cu 2,5‰ în august, septembrie și octombrie, cînd nivelul a fost scăzut. Se poate formula concluzia potrivit căreia nivelul ridicat al nitraților din apa de băut, care determină producerea methemoglobinei, este o cauză care poate mări mortalitatea infantilă.

În statul California (S.U.A.), dar și în Israel, R.F. Germania, Franța etc., în zonele în care terenurile agricole primesc cantități masive de îngrășăminte cu azot peste limitele admise, analiza apelor freatice a evidențiat efectele negative ale suprafertilizării asupra calității apelor freatice. De exemplu, în Franța[1], în bazinul Sena-Normandia din 6 200 puncte de apă (surse, foraje, puțuri) analizate, mai mult de 250 arată cantități de nitrați peste norma admisă de 40 miligrame/litru. În păduri, pășuni și culturi furajere între 0—18 mg/l, iar în zonele cu culturi intensive între 20 și 130 miligrame azotați pe litru.

În legătură cu aceste conținuturi ale apelor în azotați, Organizația Mondială a Sănătății a stabilit că: nivelurile extreme admise sînt de 44 mg/l apă potabilă. La 50 mg/l de nitrați apar riscuri grave, iar 100 miligrame/litru produc otrăvire în masă, asemenea concentrații pot provoca „boala albastră" sau methemoglobina, afecțiune uneori cu consecințe mortale. De altfel nitrații din apa de băut pot fi la originea cancerelor căilor digestive la oamenii adulți.

Primele cazuri de cianozare (asfixiere și moarte) a unor sugari datorită combinării nitriților cu hemoglobina și producerii methemoglobinei au fost depistate de medicii americani, apoi și de cei din Franța, R.F. Germania, R.S. Cehoslovacia și Israel.

În „Analele Institutului de Cercetări pentru Pedologie și Agrochimie", vol. XLI V,1980, paginile 203—212[2] C. Răuță, C. Oancea și Florentina Dumitrescu au prezentat rezultatele analizelor din perioada 1976—1977 privind acumularea nitraților în sol și apa freatică din sistemul de irigație Sadova-Corabia, județul Dolj. Au fost analizate peste 100 probe de apă din fîntîni, izvoare, bălți și canale situate în cuprinsul sistemului care include 17 localități (două din afara perimetrului irigat).

[1] Denis-Lempereur J., *Nitrates: le seuil d'alarme*, în „Science et Vie", Nr. 738, III, Paris, 1979.

[2] Răuță C., C. Oancea, Florentina Dumitrescu, *Aspecte privind poluarea solului și a apelor subterane cu nitrați în zona Sadova — Corabia*, în „Analele I.C.P.A", vol. XLIV, 1980.

În sistemul de irigație Sadova-Corabia sînt administrate anual îngrășăminte cu azot în doze variabile și există îngrășătorii de animale. Condițiile pedoclimatice caracteristice și exploatarea diferențiată a terenurilor face ca azotul să fie folosit de culturi sau spălat în proporții foarte variabile.

În consecință în unele din localitățile din zona cercetată (în 10), analizele au relevat că în fîntîni conținutul de nitrați este cuprins între 117 și 597 miligrame la litru de apă, din care în cinci, între 225,8 și 597,0 miligrame azotați la litrul de apă.

Potrivit autorilor, acumularea azotaților în apa freatică într-o proporție îngrijorătoare a fost favorizată de solurile nisipoase și precipitații, de normele de irigare prea mari, de supraîngrășarea cu îngrășăminte cu azot și organice, de sistemul de agricultură aplicat ș.a.

Necesitatea de a introduce mai multă ordine în folosirea substanțelor chimice în agricultură a fost subliniată de tovarășul Nicolae Ceaușescu, secretar general al P.C.R., în Cuvîntarea restită la consfătuirea de lucru de la C.C. al P.C.R. din 19—20 august 1982, în care, printre altele, se precizează: „Cred că la noi este un exces de chimicale. În această privință conducerea Ministerului Agriculturii a alergat după tot ceea ce a văzut că s-a scris într-o revistă sau alta. Nu avem încă puse la punct în mod corespunzător sistemele de combatere a bolilor la plante, de erbicide. Facem exces și din acest punct de vedere, cu urmări chiar dăunătoare și pentru producție, și pentru sănătatea oamenilor".

Efecte ale fosforului și fosfaților

În bazele azotate și în acizii nucleici (ADN și ARN), în proteine, enzime și în substanțele cu rol energetic (ATP, ADP ș.a.) în orice celulă, țesut și organism viu, alături de

azot (C, H, O și S), un rol structural important îl îndeplinește fosforul (P). În fotosinteză și în respirație o serie de combinații între glucide și acidul fosforic (P_2O_5) intervin în funcțiile plastidelor (acidul fosfogliceric, esterii fosforici ai triozelor, pentozelor, hexozelor) și mitocondriilor (de a căror structură și activitate sînt legate reacțiile de oxidare — degradare — a glucidelor, lipidelor și protidelor care sînt descompuse pînă la molecule de H_2O, CO_2, NH_3 și energie). Energia chimică liberă rezultată în respirație din degradarea glucidelor și lipidelor este înmagazinată durabil, în toate ființele vii, de unii esteri macroergici ai acidului fosforic (în special adenozintrifosfat — ATP, dar și guanozintrifosfat — GTP, citidintrifosfat — CTP, uridintrifosfat — UTP ș. a). Reacția, universal răspîndită, constă în fosforilarea unui ribonucleotid difosfat într-un ribonucleotid trifosfat după formula generală:



$$ADT + P + E \rightarrow ATP \text{ (sau } ADP \sim P),$$

în care $\sim$ simbolizează o legătură bogată în energie (macroergică).

Esterii fosforici macroergici sînt termodinamic instabili, prin hidroliza lor se eliberează cantitățiі mari de energie, peste 6 calorii/mol. (În procesul fosforilării, o grupare fosfat din ATP este transferată pe o moleculă de acceptor. Deci, din hidroliza ATP rezultă adenozindifosfat și o grupare fosfat — ADP + P. Reacția este reversibilă). Aceste substanțe, de exemplu ATP, reprezintă o moleculă organică mică, solubilă, neproteică, care funcționează ca o coenzimă asociată cu o enzimă (apoenzimă). Ea vehiculează sarcina sa electrică (prin reacții enzimatice, controlate) diferitelor verigi ale metabolismului celular care se desfășoară cu aport de energie. Activitățile chimice, osmotice, electrice și mecanice ale metabolismului celular (anabolism și catabolism) sînt asigurate energetic de fosfații macroergici. Aceștia, pe lîngă furnizarea energiei necesare proceselor metabolice (absorbție, secreție, excreție, activitate electrică, reglarea permeabilității etc.), pe baza catalizei, reglării enzimatice și a decodificării programelor genetice, asigură, de asemenea, travaliul mecanic necesar diviziunii celulei și organitelor acesteia (mișcările cromozomilor, centriolilor, contracția moleculelor proteice din tubulii fusului de diviziune, cililor ș.a.).

Deosebita importanță a fosforului derivă și din faptul că acest element, pe lîngă prezența sa în structura acizilor nucleici, în compușii macroergici și în substanțe de bază pentru procesele vitale (fosfatide, fosfoprotide), participă la o serie de procese enzimatice cu rol în diverse funcții ale organismului. Astfel, a fost stabilit faptul că o aprovizionare echilibrată cu fosfor contribuie la o mai bună adaptare a plantelor la condiții de secetă, fiind necesare cantități mai mici de apă pentru sinteza unei unități de substanță uscată. Totodată, fosforul stimulează maturarea și fructificarea precum și creșterea diferitelor organe vegetative.

Insuficiența fosforului în solurile cultivate este sesizată curînd de plante, acestea își încetează creșterea, frunzele devin fragile, rămîn mici și capătă o culoare violacee-roșcată, florile avortează, scade-capacitatea de fructificare, fructele crapă și au o rezistență mică la păstrare etc.

Solurile din țara noastră, în stratul de la 0 la 20 cm, conțin între 0,03 și 0,24% P_2O_5 (fosfor total). Înseamnă la hectar o rezervă totală de fosfor (de la 0—20 cm) de 0,86 t la 5,75 t P_2O_5 (în podzol, respectiv cernoziom). El își are originea în rocile pe care au luat naștere diferitele soluri.

Din cantitatea totală de fosfor din sol doar o mică parte este potențial asimilabilă, în medie între 1—5%, în cursul perioadei de vegetație. Cantitatea este obținută în solvenți convenționali, dar ea este mai mică după fosforul solubil în apă (între 3 și 24 ppm). Fosforul solubil în apă este ușor accesibil plantelor (în această categorie intră și îngrășămintele chimice: superfosfații și metafosfații. Acestea se produc industrial din acid fosforic și roci fosfatice brute).

Plantele utilizează o parte (disponibilă) din ionii fosforici ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} și H_3PO_4) din soluția solului. Cel mai accesibil este ionul $H_2PO_4^-$ la pH 4—5 și scade la o reacție alcalină -pH 7,5. La pH 6,5 accesibilitatea $H_2PO_4^-$ și HPO_4^{2-} este egală, la pH alcalin ($pH^{>8}$ crește concentrația ionilor PO_4^{2-}). În întreaga perioadă de vegetație plantele absorb între 40 și 100 kg/ha P_2O_5 (15—30 kg P cerealele, 50—70 kg P rădăcinoasele, 20—35 kg P pomii fructiferi etc.).

Cultura plantelor reduce treptat conținutul natural al solurilor în fosfor. Reducerea este mai lentă în solurile neîn-

grășate și rapidă în solurile îngrășate unilateral cu îngrășăminte cu azot. De exemplu, într-o rotație grîu — porumb, utilizarea în fertilizare doar a azotului, în 7 ani, a determinat reducerea conținutului în fosfor convențional solubil al solului de la 14,7 ppm la 9,8 ppm[1]. Paralel o fertilizare echilibrată cu azot și fosfor a ridicat fosforul solubil la 25,5 ppm, nivel care reprezintă o stare de aprovizionare foarte ridicată în fosfor.

Lipsa fosforului disponibil din solurile de cultură a impus dezvoltarea industriei îngrășămintelor cu fosfor. Astfel, în România, în 1979 au fost produse 709 000 t îngrășăminte fosfatice (100% P_2O_5; revenind 32 kg P_2O_5 pe locuitor). În agricultură au fost folosite 404 300 t îngrășăminte fosfatice (în medie 27 kg P_2O_5 la hectarul de suprafață agricolă).

Coeficientul de folosire de către plante, în primul an, a îngrășămintelor cu fosfor este între 10—45% P_2O_5. Restul îngrășămintelor fosfatice se acumulează în sol în compuși mai greu accesibili plantelor. Datorită coeficientului scăzut de utilizare (1/10 pînă la 1/2) obișnuit cantitățile de îngrășăminte cu fosfor aplicate sînt de 2—3 ori mai mari față de cantitatea necesară pentru o recoltă.

Excesul de îngrășăminte cu fosfor poate ajunge în apele rîurilor sau în pînza de apă freatică. Aceasta este partea foarte negativă a utilizării îngrășămintelor cu fosfor. Sporirea conținutului apelor în fosfor, mai ales a apelor stătătoare (lacuri) stimulează creșterea algelor și a altor specii vegetale care se acumulează la suprafață. Este împiedecată astfel pătrunderea luminii solare pentru fotosinteză și a oxigenului în adîncime. Or, lipsa circulației verticale a oxigenului și lipsa acestuia favorizează declanșarea unor procese anaerobe de descompunere, care dăunează vieții animalelor acvatice.

În lipsa nitraților și fosfaților din îngrășămintele chimice și industrie (deci, doar în prezența sărurilor nutritive provenite din natură), apele lacurilor sînt limpezi, puțin populate cu alge, ciclul ecologic se desfășoară normal, iar peștii găsesc condiții de viață optime. În prezența unui surplus de substanțe nutritive algele proliferează rapid, și mor tot atît

[1] Hera Cr., L. Ghinea, Gh. Eliade, *Mecanismul de reechilibrare a biocenezelor din solurile agricole*, în *Probleme ale agriculturii contemporane*, Edit. Ceres, București, 1977.

de rapid, sporind cantitatea de substanțe organice de pe fundul apelor dulci stătătoare. Aceste substanțe organice, pentru descompunere bacteriană și transformare în compuși anorganici necesită oxigen. Cu cît crește cantitatea de substanță organică, cu atît crește și cererea de oxigen. Dar pătura densă de alge de la suprafață împiedică pătrunderea oxigenului , fapt care duce treptat la eliminarea speciilor valoroase de pești, ca urmare a eutrofizării sau suprafertilizării apelor.

În eutrofizarea apelor dulci (rîuri, lacuri), la fosfații din îngrășăminte se adaugă fosfații din detergenții scurși din canalele orașelor și din apele reziduale secundare ale instalațiilor de epurare, precum și nitrații aduși de pe terenurile agricole masiv fertilizate. Impurificarea apelor se face și direct prin materia organică deversată sub forma apelor uzate (care conțin 7—9 g P_2O_5 pe locuitor și zi) și a deșeurilor industriale și agricole (ca și pesticidele și alte substanțe toxice).

Deci atenție, suprafertilizarea, pe lîngă sporirea producției, poate determina, mai mult sau mai puțin, în funcție de condiții: degradarea solului, prin depășirea ritmului de reconstituire a humusului din sol, acumularea unor substanțe toxice greu biodegradabile (de exemplu, a unor pesticide) și poluarea apelor de suprafață.

SUTELE DE SUBSTANȚE CHIMICE SINTETICE ȘI EFECTELE LOR...

... benifice

Agricultura industrială și comunitățile umane avansate economic implică obligatoriu dezvoltarea industriei chimice. La o primă vedere intensificarea agriculturii și asigurarea belșugului pentru o populație în plină creștere apare condiționată de producerea și utilizarea a patru-cinci grupe de substanțe de sinteză: îngrășămintele chimice, protectorii

culturilor: pesticidele (insecticide, fungicide, erbicide etc.), substanțele de creștere a plantelor și animalelor, antibioticele și antioxidantele. Fabricarea acestor grupe de compuși presupune existența altor substanțe precursoare și intermediare realizate prin tehnologii mai mult sau mai puțin complicate, fiind incluse numeroase și diverse elemente și molecule chimice.

De exemplu, fabricarea îngrășămintelor cu azot (obiș-nuite) se bazează pe folosirea sărurilor unor acizi tari (H_2SO_4, HCl, HNO_3) cu amoniu (NH_4^+) sau ale acidului azotic cu diferiți cationi (K^+, Na^+, Ca^{2+}), precum și ale unor acizi organici cu amoniu sau derivați aminici (plus azot elementar N_2, hidrogen H... cel puțin 11 elemente într-o multitudine de combinații + energie). În pesticide, o mulțime de alte elemente. Astfel, în combaterea bolilor plantelor substanțele anorganice utilizate au la bază sulful, cuprul, mercurul și compușii lor, iar substanțele organice au la bază tiocarbamați, ftalimide, tiurami, nitroderivați, compuși organo-stanici ș.a. Protecția plantelor față de insecte, nematozi, acarieni ș.a. este asigurată de aproape 20 de tipuri de produse, care au în compoziția lor derivați ai arsenului, fluorului, bariului, sul-fului, zincului, precum și uleiuri minerale, dinitrofenoli, substanțe organice clorurate (DDT — diclordifeniltricloretan, HCH — hexaclorcilohexan, care se cumulează în corpul animalelor și omului), organofosforice (parathionul — cu toxicitate acută pentru om și animale, inclusiv albine), carbamați și multe, multe alte combinații chimice. Pentru combaterea buruienilor din principalele culturi, în 1980, în România, au fost folosite cel puțin 35 erbicide diferite pe scară mai largă avînd la bază peste 20 substanțe active: triazine, 2,4-D, derivați ureici, ai acidului fenoxi — fenoxi — propionic, dibutalin, butilat, trifluralin, ș.a.). La acestea se adaugă diverse substanțe de creștere a plantelor (auxine, gibereline, abscisine, citokinine, etilenă ș.a.) precum și vitaminele, hormonii, antibioticele, antioxidantele folosite în industria alimentară în vederea înhibării oxidărilor, pentru impiedicarea degradării grăsimilor etc.

A fost trecută în revistă, pe scurt, gama extrem de largă a substanțelor folosite direct în agricultura industrială. Aceasta apare ca o ramură puternic chimizată. Utilizarea

acestor substanțe a fost apreciată, în principal, în privința efectelor benefice nemijlocite asupra culturii plantelor și creșterii animalelor. Așa cum s-a menționat, îngrășămintele chimice au determinat sporirea de cîteva ori a producțiilor plantelor cultivate. Constanța și stabilitatea producțiilor a fost asigurată prin folosirea protectorilor culturilor care au redus sau au înlăturat atacul unor boli și dăunători. Erbicidele au eliminat buruienile din culturi, iar împreună cu mecanizarea au redus la minimum munca manuală în agricultură (pînă la sub 10% din populația activă a țărilor avansate). Aceste două grupe de substanțe împreună cu cele care influențează creșterea plantelor (precum și irigarea) fac din agricultură un proces productiv, în mare măsură pus sub control și eficient economic...

...și dăunătoare

Oriunde pe glob, suprafertilizarea, necunoașterea efectelor în ansamblu a chimicalelor sintetice asupra plantelor cultivate și a celorlalte viețuitoare din ecosistem asupra omului și habitatului său, nerespectarea cu strictețe a dozelor de pesticide și aplicarea lor empirică nu a întîrziat să se manifeste. Acțiuni umane avînd drept obiectiv intensificarea producției agricole au relevat laturi nebănuite, care constituie adevărate agresiuni asupra mediului biotic și contaminări degradante ale mediului abiotic. Multe dintre ele sînt deosebit de grave.

În ultimii 10—15 ani au fost făcute numeroase observații și analize științifice, care au atras atenția asupra pericolelor imediate și potențiale ale includerii sau folosirii în arsenalul agricol a unora dintre acești compuși chimici. Contaminarea apelor dulci de nitrații și fosfații din îngrășămintele chimice cu toată gravitatea ei reprezintă doar un aspect cu consecințe imediate, biologice, asupra omului. Să urmărim însă și alte aspecte, inclusiv dereglările de ordin genetic care amplifică efectele negative, deoarece afectează mediul de viață și viața însăși.

Dependența de pesticide

În latină *de+pendere* înseamnă a atîrna. În medicină „dependența" este o stare psihoorganică care constă în necesitatea unor indivizi de a consuma un medicament sau o substanță stupefiantă administrată repetat (starea este favorizată de calmarea durerii, acțiunea liniștitoare sau euforizantă etc); întreruperea sau scăderea dozelor provoacă apariția stării de boală, tulburări psihice, labilitate emoțională etc.

Utilizarea pesticidelor, ca și a îngrășămintelor anorganice cu azot, produce dependența agriculturii de aceste produse. La începutul aplicării lor, dozele de pesticide folosite, cu toate că erau mici, aveau eficiență în protecția culturilor agricole. Ulterior, pentru realizarea eficienței inițiale în combaterea diverșilor dăunători și menținerea nivelului producției a fost necesară creșterea din ce în ce a dozei, complexarea substanțelor sau sintetizarea unor compuși noi, mai toxici. De exemplu, în S.U.A. între 1950—1967, cantitatea de pesticide folosită la unitatea de producție agricolă a crescut cu 168%; la bumbac, în statul Arizona, cantitatea de insecticide s-a triplat (între 1956—1967). Cauza? La începutul utilizării, de exemplu, a insecticidelor, cu toate că acestea erau aplicate doar împotriva unui anumit dăunător, ele au omorît concomitent cu dăunătorul vizat și paraziții și prădătorii sau dușmanii naturali ai acestuia. În aceste condiții, deci, în lipsa prădătorilor, utilizarea insecticidului devine o necesitate anuală sau la fiecare ciclu vital al dăunătorului. În plus, specia dăunătoare tinde să dobîndească rezistență la insecticidul inițial, datorită apariției unor genotipuri noi recombinante (în urma hibridărilor) sau mutante (în urma mutațiilor genice). Ca urmare, sînt necesare cantități tot mai mari din același insecticid sau producerea unor insecticide noi, care, treptat, devin vechi... și așa mai departe. Astfel, cultura intensivă a oricărei specii vegetale, reprezentată de soiuri ameliorate, alcătuite din puține genotipuri (la plantele autogame) sau dintr-un singur genotip la hibrizii F_1 și clone, cu mult mai mult la speciile perene și la cele din spații acoperite, devine absolut dependentă de pesticide. Deci, nu sporirea producției impune creșterea

dozelor, complexarea și diversificarea producției de pesticide, ci, pe de o parte eliminarea serviciilor prădătorilor care constituiau un concurent redutabil natural deosebit de eficient și gratuit, iar pe de altă parte adaptarea genotipică a dăunătorilor și dobîndirea treptată de către aceștia a rezistenței la noile pesticide.

Este știut că nici o specie dăunătoare nu a dispărut în urma tratamentului cu pesticide, ci a evoluat spre forme mai rezistente, în schimb au dispărut dăunătorii dăunătorilor, iar diverse specii utile (albine, polenizatori ș.a.) au avut de suferit.

În multe dintre aceste efecte negative sînt implicate produsele organice de sinteză pe bază de clor, cum sînt insecticidele cloroderivate: DDT, HCH și altele. DDT-ul a fost sintetizat în 1874, în Elveția, dar proprietatea sa insecticidă a fost sesizată abia în 1939, iar pe scară largă a fost folosit în 1944. De atunci, metodele mai vechi de combatere a insectelor au fost înlocuite de DDT și apoi de alte insecticide sintetice. Succesul noii metode a fost determinat de eficacitatea ridicată în distrugerea unui mare număr de insecte dăunătoare plantelor, animalelor și omului. Nu puteau fi bănuite efectele secundare negative ale DDT: poluarea puternică prin reziduuri, apariția de rase rezistente, distrugerea echilibrului biocenotic etc. Astfel, produsele cloroderivate sînt netoxice pentru acarienii fitofagi (*Bryobia rubrioculus*), *Panonychus ulmi*, *Tetranychus urticae*, *Eotetranychus carpini* șa.a.), dar extrem de letale pentru dușmanii lor naturali (acarienii: *Phytoseiulus persimilis*, *Typhlodromus* sp., *Tydeus* sp., ș.a. și insectele *Stethorus punctillum*, *Chrysopela* sp. ș.a.). În condiții de dereglare a echilibrului biocenotic, populațiile de acarieni, îndeosebi a celor din plantațiile de pomi fructiferi și viță de vie, precum și din sere, au crescut exploziv, an de an avînd loc atacuri puternice. Această situație a impus sinteza unor substanțe cu acțiune acaricidă.

DDT-ul și recrudescența malariei. Cea mai dramatică situație rezultată din inducerea unor mutante rezistente prin folosirea insecticidului DDT o constituie reînvierea malariei sau paludismului. Aceasta este o boală endemoepidemică, sezonieră (în zona temperată), răspîndită pe tot

globul, provocată de hematozoarul palustru (*Plasmodium falciparum, P. malariae, P. vivax, P. ovale*), avînd ca sursă și rezervor de infecție omul infestat, de la care agentul patogen se transmite la omul sănătos prin țînțarul Anofel (*Anopheles gambiae, A. balabacensis, A. albimanus*).

În genul *Anopheles*, masculii sînt vegetarieni, iar femelele au nevoie de sînge uman. Prin saliva care pătrunde în corpul victimei sau prin sîngele preluat de la bolnav, agentul malariei este vehiculat de la un om la altul. Deci, țînțarul de sex femel, fiind hematofag și antropofil, este gazdă intermediară și obligatorie a protozoarelor din genul *Plasmodium*.

Hematozoarul este un parazit care trăiește în sînge, în celulele roșii (hematii). Prin saliva țînțarului în corpul victimei sînt introduse formele infective ale hematozoarului — sporozoizii. După 30 de minute de la înțepătură, aceștia, din vene, ajung în ficat, unde în hematocită (celula ficatului) se multiplică, luînd forma unui nucleu celular multiplu, cunoscut sub denumirea de schizont. După 6—12 zile schizonții se rup și liberează în sînge numeroși merozoizi. Aceștia pătrund în celulele roșii, în care cresc și se divid formînd alți schizonți. Apoi, schizonții se rup distrugînd celulele roșii și liberînd noi merozoizi care infectează noi hematii și ciclul continuă. Simptomele cele mai grave ale malariei constau tocmai în ruperea schizonților în celulele roșii.

Unii merozoizi asexuați, în sistemul sanguin, se transformă — după cîteva generații — în forme sexuate mascule și femele, numite gametocite. Din corpul bolnav, prin înțepare, acestea pot ajunge în stomacul țînțarului femel, în care se transformă în gameți, din fecundarea cărora rezultă un ou (zigot). Ouăle traversează pereții stomacului și se transformă în sporozoizi. După ajungerea la maturitate, sporozoizii migrează în glandele salivare ale țînțarului și de aici prin înțepare într-o nouă victimă... și ciclul infecțios se reia.

Sînt grave cazurile de malarie comatoasă, pernicioasă și septicemică (în care fiecare a 3-a sau a 2-a hematie este parazitată) care obișnuit au un sfîrșit mortal.

Scurt istoric: 1945 — se naște speranța că malaria, boala cea mai răspîndită în lume și care omora mai mult decît oricare alta, va putea fi pusă sub control. Începînd din acel an, țînțarul și aliatul său parazitul malariei, pe care-l poartă în el, sînt combătuți masiv și sistematic, cu insecticidul „minune"-DDT.

...1954 — O.M.S. (Organizația Mondială a Sănătăți) declara că malaria a fost eradicată.

...1977 — Asia, Africa, Mediterana Orientală, America Centrală, America de Sud numără bolnavi de malarie cu milioanele: în lume sînt atinși de malarie peste 200 milioane oameni (mai mult de 6 milioane în India) — de 100 de ori mai mult decît în 1962; 2 milioane în Sri Lanka, 500 000 bolnavi în Turcia; în Africa malaria omoară în fiecare an aproximativ 1 milion de copii (10% din mortalitatea infantilă). Numeroase cazuri de îmbolnăvire sînt menționate în Europa și America de Nord, la emigranții din regiunile contaminate, sau, importate de turiști, de muncitorii asistenți etc.

Revenirea neașteptată, în forță, a malariei a fost determinată de două cauze principale:

— *prima* — apariția unor rase de țînțari rezistente la DDT, principalul insecticid folosit, nu numai în campaniile antimalarice, ci și în agricultură. Faptul că în agricultură dozele de DDT aplicate nu erau letale pentru țînțari a creat condiții pentru apariția unor genotipuri cu rezistență crescută. La fel s-a întîmplat și față de alte insecticide organoclorurate, organofosforice și carbamați. Deci alte insecticide;

— *a doua* — apariția unor rase de hematozoar palustru rezistente la medicamentele antimalarice cele mai folosite: chinină (alcaloid chinolinic) și clorochină (amino-4-chinolină). Apărute la început, concomitent la extremitățile lumii, în Asia de sud-est (Thailanda și Vietnam) și America Centrală, rasele rezistente de *Plasmodium* au cucerit curînd zonele tradiționale ale acestei boli. Rasele parazitare rezistenze la clorochină sînt distruse 100% de noul antimalaric meflochina (precedat de tratamentul cu chinină), care este însă scump. Dar, pînă cînd?

Produse cancerigene, teratogene, mutagene

Mediul uman este încărcat cu mii de compuși chimici, sintetizați recent. Fiind produse de om, nu de natură, numeroși dintre acești compuși nu-și găsesc corespondenții

în arsenalul enzimelor de degradare din mediul natural. Ca urmare, mulți dintre acești compuși după folosirea în cultura plantelor, în creșterea animalelor, direct sau indirect de către om, dacă nu sînt distruși prin ardere, se acumulează sub formă de deșeuri, pe sol sau în sol, în ape, în aer, sau în diverse organisme vii, inclusiv în unele organe ale corpului uman.

Din punct de vedere biochimic unii dintre compuși sînt inerți, alții activi. De exemplu, masele plastice sînt inerte biochimic, în timp ce pesticidele (ca și medicamentele de sinteză), produse pentru distrugerea voită a unor organisme-țintă, după transformarea în deșeuri, fiind nebiodegradabile, pot afecta, pe diferite căi, și alte organisme din mediul de acumulare. Se știe, de exemplu, că DDT-ul acționează asupra insectelor prin atacarea proceselor biochimice din sistemul nervos al acestora. În sol, DDT-ul ca de altfel și alți derivați organici clorurați, precum și compușii organofosforici sînt ingerați de numeroasele nevertebrate (viermi, greieri, gîndaci, melci) care se hrănesc cu materie organică. Prin consumul nevertebratelor de către păsări (și alte animale) DDT-ul se concentrează, interferă cu acțiunea enzimelor din ficatul acestora, inhibă formarea cojii la ouă și în final insecticidul poate ajunge în alimentația umană. În general, DDT-ul se cumulează în grăsimea animalelor (carne, untură, lapte, unt) prin intermediul căreia este ingerat de om.

Studiile efectuate de neurologii F.D. Duffy și J.L. Burchfield, la Universitatea Harvard, S.U.A., relevă unele din efectele biologice grave produse de compușii organofosforici asupra omului. Aceștia susțin că chiar doze slabe din compușii organofosforici, prezenți practic în toate pesticidele, inclusiv în aerosolii destinați a omorî insectele din locuințe, pot provoca alterarea funcției creierului. Au fost analizate efectele produse de intoxicația accidentală a unor oameni cu sarin, un compus aproape identic chimic cu malathionul și parathionul, care sînt folosite curent ca pesticide. Oamenii intoxicați sufereau de tulburări neurologice: anxietate, insomnii, pierderea memoriei, iritabilitate și impotență sexuală. Tulburările acute (convulsiile) pot fi comparabile cu simptomele schizofreniei și epilepsiei. Electroencefalogramele realizate la oameni (și maimuțe) intoxicați sesizează aceste tulburări care sînt asemănătoare acelora produse de trecerea

unor unde rapide - beta - sau de substanțe neurotrope (mescalina și LSD).

Alt pesticid — captanul (N-(triclor-metil-tio)-ciclohexan dicarboximida) — utilizat ca fungicid pentru combaterea unor agenți patogeni, cu deosebire a speciilor de *Venturia, Monilinia, Endostigme, Plasmopara viticola* ș.a., selectiv pentru unii acarieni prădători, dar toxic pentru alții ca și pentru speciile de insecte din ordinul *Hymenoptera* (viespi, albine, furnici), din familia *Miridae* (din ordinul *Heteroptera* — ploșnițe) ș.a., tot la păsări, s-a constatat că are acțiune teratogenă asupra embrionului, rezultînd pui cu anomalii, malformații și monstruozități.

Trebuie reținut (din analizeze efectuate de J.J. Graham-Bryce, în 1976) că proporția de insecticid sau fungicid eficientă în combatere este extrem de redusă, variind între 0,02% și 6% din cantitatea aplicată. Restul se cumulează în sol sau se volatilizează.

Anual se folosesc cantități uriașe de erbicide. Unele din acestea dispar total din sol după un timp relativ scurt (erbicidul 2,4-D dispare după 4 luni). Altele, triazinele, derivații ureici și uneori fluralinele, au o mare persistență în sol. De exemplu, atrazinul are eficacitate biologică timp de 120—135 zile, iar simazinul 90—120 de zile. Atrazinul persistă însă în sol pînă la 18 luni[1] (pierderea toxicului ajunge la 96%), iar terbumetonul depășește cu mult 18 luni (pierderea toxicului ajunge la 88%). Erbicidele ureice monolinuronul și linuronul au o persistență și mai mare; după 18 luni toxicul se pierde doar în proporție de 47%, respectiv 40%. Microorganismele din sol nu pot ataca inelul triazinic și mai puțin compușii ureici. Înseamnă că enzimele naturale sînt inactive față de aceste erbicide și deci ele trebuie să se cumuleze undeva. Unele cercetări le-a semnalat prezența și după 12 ani de la administrare. Din erbicidele administrate doar o parte neînsemnată este agrodisponibilă adică absorbită de buruieni. (T. Baicu și A. Caramete, 1980). De exemplu, proporția din erbicidul trifluralin (din Treflan) absorbită de buruieni din sol a fost cuprinsă între 13,28 și 22,81% cînd s-a admi-

[1] Polizu Al., A. Caramete, E. Diaconu: „*Persistența în sol a unor erbicide*", în vol.: *Folosirea rațională a erbicidelor: Al II-lea Simpozion Național de Herbologie*, Pitești, 1980.

nistrat doza de 1,92 substanță activă — s.a. kg/ha și între 4,21—5,00% cînd doza a fost de 3,84 s.a. kg/ha. Rezultă că în cazul dozei mai mici (1,92 s.a. kg/ha trifluralin) din erbicid s-a pierdut între 77,19—86,72%, iar în cazul dozei mai mari s-a pierdut între 95,00—95,79% (în buruieni, planta de cultură, sol și volatilizare).

În mod normal, în sol, cea mai mare parte a erbicidelor triazinice se găsește fixată prin adsorbție pe humus și argila acestuia. Or, erbicidul adsorbit nu acționează asupra plantelor (efectul fitotoxic este produs de erbicidul rămas liber în soluția solului), dar poate acționa ca și produsele anticriptogamice asupra unor microorganisme utile din sol. Astfel, tratamentul cu atrazin, în doze crescînde de 5, 10, 20 kg/ha (pe lîngă remanența în sol după 12 luni de la aplicare a unor cantități reprezentînd 0,474 ppm, 0,961 ppm și, respectiv, 1,158 ppm corespunzător dozelor aplicate), determină o depresiune numerică a microflorei din sol proporțional cu doza aplicată inițial (numărul bacteriilor a scăzut de la 17, fără atrazin, la 4,5 la doza de 20 kg/ha; n × 10^6, iar a fungilor de la 112, fără atrazin, la 81, la doza de 20 kg/ha; n × 10^3). Deci atrazinul acționează ca factor stresant asupra înmulțirii microflorei, în special a bacteriilor din sol. Totodată, atrazinul inhibă activitatea zaharazică din sol. La fungul *Aspergilus niger* erbicidele blochează procesul respirator și enzima Q cu rol în procesele oxidative generatoare de energie.

Ca și în cazul insecticidelor și fungicidelor și în cazul erbicidelor apare fenomenul de dependență. Unele specii de buruieni mai puțin agresive au dispărut (*Plantago indica, Polygonum arenarium* ș.a.), în timp ce altele, foarte rare înainte de administrarea îngrășămintelor chimice, a irigării și a erbicidelor, au devenit foarte frecvente (*Amaranthus retroflexus, Chenopodium album* ș.a.). Dăunătoare este apariția unor specii de buruieni deosebit de agresive, rezistente la erbicide (*Sorghum halepense, Xanthium strumarium, Solanum nigrum, Equisetum arvense* ș.a., la acestea se adaugă speciile *Cynodon dactylon, Digitaria sanguinalis, Cirsium arvense* ș.a.). Combaterea acestor buruieni este posibilă fie prin utilizarea unor doze mai mari din erbicidele obișnuite (cînd pot fi dăunate și plantele de cultură și redusă recolta), fie prin aplicarea amestecurilor cu acțiune biologică complementară sau prin sinteza unor noi erbicide cu toxicitate mai mare, selectivă... și așa mai departe.

Erbicidele sistemice sînt absorbite radicular de plantele cultivate protejate și translocate prin xilem în toate organele plantei, inclusiv în fructe. Ele intervin pe diferite căi în metabolismul plantei cultivate, determinînd, în final, acumularea anumitor componente în diverse organe și micșorarea conținutului în altele. Astfel, în plantele de tomate (rădăcini, tulpini, frunze), după 14 zile de la administrarea erbicidului Treflan în doza de 1,92 s.a. kg/ha s-au găsit între 5.93 și 8,74% din doza aplicată. Pentru om dăunătoare sînt însă reziduurile de erbicide existente în recoltă. De pildă, din erbicidul ureic Linuron administrat la căpșun, primăvara înainte de înflorit, în doze de 0,5 și 1,5 s.a. kg/ha reziduul din fructe a fost de 0,620, respectiv, 0,970 ppm, cu mult mai mare de toleranțele admise. Reziduurile altor erbicide (triazinice) sînt inferioare toleranțelor admise.

Acumularea în sol a reziduurilor erbicidelor (și a altor pesticide), cu efectul lor toxic pentru microfloră și organismele nevertebrate, care ajung indirect în alimentația omului și a unor animale, fac ca acestea să se intoxice prin consumul unor organe vegetale care conțin reziduuri de erbicide. Alături de acestea unele erbicide pot avea și alte efecte nedorite. Astfel, recolta plantelor cultivate poate fi afectată negativ. Cauza constă în afectarea aparatului fotosintetizator al plantei cultivate, prin deteriorarea ultrastructurii cloroplastului și prin acumularea de amidon în cloroplaste, fapt care determină o inhibare a respirației.

Multe dintre erbicide blochează sinteza ADN și ca urmare inhibă diviziunea celulară. Unele substanțe analoage bazelor purinice și pirimidinice: 6-mecarptopurina, 5-fluorouracilul, 4-azouracilul și 5-bromuracilul ș.a. sînt inhibitori ai duplicării ADN, iar mercaptoetanolul este inhibitor al fusului de diviziune (ca și colchicina).

Pesticidele pun în pericol plasma germinativă

Unele dintre cele mai grave efecte ale erbicidelor ca și a altor pesticide sînt cele de ordin genetic. Ele pot apărea la buruieni și la plantele cultivate. Și trebuie admis că dacă pesticidele afectează diviziunea celulară la plante, în anumite doze și condiții, ele pot afecta și aparatul mitotic și genetic la animale de experiență, în culturi de celule *in vitro*, și chiar *in vivo*, celula umană.

Să exemplificăm cu erbicidele Dymid și Cobex[1] folosite pentru combaterea buruienilor în cultura tomatelor. Tratamentele în laborator, la sămînță în doze de 0,5; 1,0 și 2,0 substanță activă kg/ha induc anomalii în 18 pînă la 55% dintre celulele analizate (cromozomi univalenți, multivalenți, punți cromatice, fragmentări cromozomale, nuclei de restituție ș.a.). La doza de 1,0 s.a. kg/ha (doză eficientă ca erbicid) numărul celulelor afectate ajunge la 27—28%. Aceste anomalii, care reprezintă efecte biologice (la individ) și efecte genetice care se manifestă la întreaga serie de descendenți relevă faptul că erbicidele și cu atît mai mult unele insecticide și fungicide, la care se adaugă atîtea emisii industriale nocive (oxizi de sulf, clor ionic ș.a.), constituie o „sabie a lui Damocles" pentru zestrea ereditară a organismelor vii. Dacă ținem seama că în sol și în organismele din el, în unele plante perene, dar mai ales în animale, aceste substanțe suferă transformări succesive, concentrîndu-se în forme bioactive ne putem da seama de pericolele potențiale pe care le reprezintă aceste substanțe pentru plasma germinativă. Formarea, de exemplu, a unor derivați chimici electrofili negativi, cu capacitatea de a se lega covalent cu acizii nucleici, reprezintă una dintre condițiile apariției unor schimbări în structura ADN și ARN: dezaminări, depurinizări, care induc „erori de încorporare", prin includerea unor baze analoage și formarea unor „perechi greșite" de nucleotizi, deleții ș.a. Astfel, apar mutații genice somatice și germinale. Mutațiile somatice care dereglează mitoza constituie principala cauză a cancerelor, iar substanțele care interferă cu embriogeneza umană, inclusiv unele substanțe folosite în dirijarea creșterii plantelor (tomate și castraveți în sere și solarii, măr, păr, căpșun ș.a.), de tipul auxinelor, giberelinelor și citokininelor (substanțe sintetice: derivații acidului alfanaftil acetic, ai acidului naftoxifenoxiacetic ș.a.), cauzează nașteri anormale. De exemplu, erbicidul 2, 4, 5-T (pulverizat în timpul războiului în Vietnam, peste păduri și culturi agricole) produce malformații congenitale la animalele de laborator. El a putut fi cauza procentului sporit de asemenea malformații înregistrate la copiii nou-născuți vietnamezi către anii '70.

[1] Crăciun T., *Genetica plantelor horticole*, Edit. Ceres, București, 1981.

Se atribuie factorilor de mediu între 70 și 90% din cauzele îmbolnăvirilor de cancer. „Cancerele profesionale" reprezintă 10—15% din mortalitatea provocată de cancer la bărbați. De altfel, din 100 de persoane moarte de cancer în Franța, în 1976, 41 erau femei și 59 bărbați, ceea ce relevă că prin specificul vieții lor bărbații sînt mai legați de factorii materiali producători de cancer (inclusiv proporția mai mare de cancer pulmonar provocat de fumat).

Substanțele chimice noi și activitatea mutagenă

Lumea industrială s-a îmbogățit cu numeroase substanțe chimice, de sinteză, inexistente pînă acum cîteva decenii. Fiind creații noi, activitatea mutagenă a acestor compuși nu era cunoscută. De altfel, însuși fenomenul mutației artificiale a fost descris abia în 1927, de geneticianul american H.J. Muller. Acesta a studiat efectele razelor X asupra genelor și cromozomilor. Descoperirea efectelor mutagene și antimitotice ale unor substanțe chimice a fost, în general, accidentală și sporadică pînă în anii '50. S-au făcut testări mutagenice pentru un număr redus de substanțe, la bacterii și unii viruși. Rezultatele obținute nu au condus însă la concluzii concrete.

Începînd cu 1953, anul descoperirii de către J.D. Watson și F.H.C. Crick a structurii acidului dezoxiribonucleic-ADN și a rolului acestuia în ereditate și în ciclul vital al celulei, a devenit posibilă cercetarea celor mai intime fenomene chimice care au loc în complexele procese biologice din inte-

riorul celulelor. Aşa a apărut problema interferenţei unor factori din mediu cu replicarea ADN, celulei, cu funcţia genelor şi a organitelor celulare. S-a descoperit că unii factori fizici sau chimici pot induce atît efecte genetice cît şi efecte biologice. Cu alte cuvinte, alături de schimbări, în plasma germinativă unii factori mutageni pot induce în celulele unor specii de animale perturbări letale sau dăunătoare, inclusiv cancer. Această noţiune, de cancer, din punctul de vedere al geneticii, cuprinde o varietate de boli diferite, caracterizate toate prin proprietatea unor celule de a se divide haotic, atunci cînd nu ar trebui să se dividă. Celula care proliferează a pierdut mecanismul controlului diviziunii. Mecanismul se află la nivel molecular, în gene.

Practic, toate tipurile de celule diferenţiate (hepatice epiteliale, osoase, pulmonare, sanguine etc.) pot să devină celule canceroase, să producă tumori şi să invadeze ţesuturi normale.

In vivo este greu de relevat originea procesului cancerizării la om. *In vitro*, în culturi de celule, au fost induse cancere cu ajutorul radiaţiilor şi al unor compuşi chimici, precum şi cu ajutorul unor viruşi, care au schimbat celula normală în una canceroasă. Prin diviziune celula canceroasă dă naştere la două celule-fiice identice cu celula-mamă, deci şi ele vor creşte şi se vor divide fără restricţie. Cauzele cancerizării constau, probabil, fie în mutaţia genei care controlează mecanismele normale de diviziune celulară, fie în infectarea celulei de către un virus oncogen care induce cancer. (De exemplu, la găini, virusul ARN al sarcomului Rous; viruşii ARN care produc leucemii la păsări, mamifere şi, probabil, la om; viruşii ADN care produc cancerul pielii la mamifere, inclusiv la om; virusul ADN-polioma la şoareci; virusul ADN-SV40 la maimuţe).

Viruşii polioma şi SV 40, cu o structură fundamentală practic identică, posedă în molecula circulară dublu-catenară de ADN 8 gene distincte. Aceşti viruşi, după infectarea unei celule gazdă, pot avea două tipuri de comportare: fie un ciclu litic (în cazuri rare: 10^{-2}) cînd se multiplică în nucleul celular producînd aproximativ 1 milion de particule virale (în 24—48 ore, la 37°C) după care celula este lizată, fie un ciclu transformat (în cazuri şi mai rare: 10^{-5}), cînd molecula

de ADN virală, după ce pătrunde în celulă, nu formează particule descendente ci transformă celula infectată într-o celulă canceroasă. Celula transformată începe să se multiplice într-o manieră dezordonată, caracteristică celulei canceroase. În celula transformată nu pot fi găsite particule virale infectante, deoarece acestea s-au integrat, printr-un crossing over, în unul din cromozomii celulei gazdă (provirus). Se consideră că în această stare (de provirus), viruşii, pentru a se putea reproduce, alterează funcţiile celulei-gazdă într-o asemenea manieră încît aceasta să poată sintetiza într-un ritm extrem de rapid molecule de acid nucleic viral şi ADN specific gazdei. Deci, într-o celulă transformată sinteza ADN şi diviziunea celulei nu mai sînt supuse mecanismelor de control care operează în celulele normale.

În general, nu se ştie dacă, la om, cancerul apare ca un efect direct al dereglărilor produse de diverşi compuşi chimici sau dacă mutagenii chimici induc schimbări în viruşi, iar viruşii mutanţi sînt cei care generează, în final, celule canceroase. Este însă o certitudine faptul că rata apariţiei cancerelor s-a amplificat rapid, paralel cu creşterea masivă a producţiei de substanţe chimice de sinteză.

Prin 1955, în diverse ţări au fost iniţiate cercetări destul de restrînse, cu privire la activitatea mutagenă a radiaţiilor şi a unor compuşi chimici asupra unor organisme inferioare: *Neurospora crassa*, *Escherichia coli* şi *Drosophila melanogaster*. Apoi cercetările au fost extinse şi la plantele superioare. Ele au relevat efectele biologice şi genetice ale unor agenţi fizici (radiaţiile) şi chimici (acidul nitros, substanţele alkylante: alilizotiociantul — gazul muştar sau iperita, etilenimina — triazina, sulfaţii şi sulfonaţii alkyl — dietilsulfat, dimetansulfonat etc.). S-a stabilit că radiaţiile produc alterarea moleculelor de acizi nucleici producînd mutaţii genice şi dislocaţii cromozomale, iar substanţele chimice produc mutaţii în urma unor reacţii chimice directe cu componentele moleculare ale acizilor nucleici.

Din raţiuni morale, omul nu poate fi folosit direct la experienţe genetice. Asupra lui nu poate fi cercetată nici activitatea mutagenă a unor compuşi chimici. Dar el, cu toate că este deosebit de complex ca individ şi are un echipament enzimatic mai bogat decît oricare alt organism viu,

la nivel molecular este asemănător, structural și funcțional, restului organismelor lumii vii. În aceste condiții, prin utilizarea principiului similitudinii și al extrapolării, s-a format concluzia că între sporirea numărului bolnavilor de cancer și al avorturilor spontane și includerea în mediul de viață a unor compuși chimici noi există o legătură indisolubilă. (Către anii '70, în S.U.A. și Canada, în medie peste 20% din femeile gravide pierdeau sarcina; analiza celulelor embrionilor și fetușilor avortați a relevat, la mai mult de un sfert din aceștia, anomalii în numărul și structura cromozomilor). Concluzia a fost probată tocmai de descoperirea că multe dintre noile substanțe chimice de sinteză au activitate mutagenă la microorganisme și plante, dar și la animale și *in vitro* în culturi de celule umane.

Punerea în seama mutagenilor chimici a numărului sporit de avorturi spontane, de copii născuți anormali (în 80% din cazuri intervin mutageni chimici, iar în 20% intervin factorii genetici), de îmbolnăviri de cancer etc. a început să se facă doar spre sfîrșitul deceniului VI. O consecință a recunoașterii efectelor biologice și genetice a compușilor chimici din mediu a fost înființarea în S.U.A., în 1969, a „Environmental Mutagen Society", avînd ca obiectiv exclusiv studiul mutagenilor din mediul înconjurător.

* * *

Organizația Mondială a Sănătății în fața numeroaselor dovezi că diversele substanțe sintetice pot afecta diferite organisme, inclusiv omul, a inaugurat un sistem de experiențe și anchete pentru cunoașterea în ansamblu a efectelor biologice și genetice a cît mai mulți dintre acești compuși artificiali, a căror listă ajunge la cîteva zeci de mii.

Pe baza analizelor întreprinse, Centrul Național de Cercetare a Cancerului (C.I.R.C.) din Lyon (aparținînd O.M.S.) a stabilit (pînă în decembrie 1979), că au efecte cancerigene 36 substanțe sau procedee industriale... iar lista continuă să crească. Faptul că în țările industrializate îmbolnăvirile cu tuberculoză, poliomielită, variolă și alte boli infecțioase sînt depășite de frecvența ridicată a cancerelor relevă pe de o parte rolul progreselor înregistrate de igienă și medicină, iar pe de altă parte faptul că în mediul uman s-au înmulțit factorii sau agenții cancerigeni.

Curba sinistră a bolii canceroase a început să crească o dată cu expansiunea industriei chimice. De exemplu, în Franța[1], din 557 114 decese înregistrate, 119 243, sau 21,4% se datorau cancerului, iar în S.U.A. s-a precizat că aproape un sfert din populație va fi atinsă de cancer și că între 5 și 10% dintre copii se nasc cu defecte congenitale.

Cercetările C.I.R.C. amintite, efectuate asupra a 442 produse chimice sau procedee industriale, au relevat că 142 (32%) sînt cancerigene pentru una sau cîteva specii animale. Dintre acestea 18 au acțiune cancerigenă certă pentru om, printre care: arseniul, azbestul, benzenul, benzidina și 2-naftilamina (coloranți sintetici), cromul, dietilstilboestrol, melfalanul, gazul muștar, eterul și clorometil-metil-eter tehnic, gudronii din funingine și din huilă, clorura de vinil ș.a. Alte 18 sînt probabil cancerigene pentru om: acrilonitrilul, aflatoxinele, auramina, beriliul, cadmiul, clorambucil, ciclofosfamida, oxidul de etilenă, nichelul, fenacetina ș.a. DDT-ul, HCH-ul și lindanul, heptaclorul, clorura de dimetilcarbamoil ș.a., potrivit analizelor sînt cancerigene sau limitat cancerigene la animalele de experiență.

Dificultatea depistării efectelor mutagene ale unei substanțe chimice este mare, deoarece este necesară o perioadă destul de lungă pînă la manifestarea la descendenți. Pentru detectarea efectului mutagen al unui factor oarecare sînt necesare minimum două generații, ceea ce la om înseamnă, în condiții normale, 20—25 de ani, eventual 40—45 de ani; pentru a urmări starea de sănătate sau mutațiile în ontogenia celei de-a doua generații (știut fiind faptul că unele fenomene clinice pot apărea doar la adult). O altă greutate este determinată de raritatea tulburărilor genetice specifice care apar doar cu o frecvență medie de la 1 la 10 000 pînă la 1 la 100 000 de nașteri. La o asemenea frecvență mică, dacă s-ar urmări, de exemplu, activitatea mutagenă a nitritului de sodiu (folosit ca adjuvant antioxidant în fabricarea mezelurilor), pentru a se putea trage o concluzie ar trebui urmăriți cu multă atenție, cel puțin 20 de ani, minimum 20 000 000 de oameni (nitritul de sodiu, ca atare, nu s-a dovedit mutagen. S-a recomandat înlocuirea sa în fabricarea

[1] Dorozynski, A. *„Substances cancérigènes: une I^e liste"*, în „Science et Vie", Nr. 747, XII, Paris, 1979.

mezelurilor și conservelor deoarece în stomacul omului se transformă în acid azotos, recunoscut mutagen al organismelor inferioare). S-au dovedit mutagene: hidrazida — la microorganisme și la șoareci — folosită în tratamentul tuberculozei, captanul — la bacterii, șoareci și culturi de celule umane — folosit ca fungicid, sterilizanții insectelor dăunătoare: trietilenfosforamida, trietilenmelamina, folosite și ca medicamente anticanceroase — sînt puternic mutagene la șoareci, hamsteri și în culturi de țesuturi umane. Acțiune mutagenă au relevat, *in vitro*, diazepamul, libriumul, ciclamații, diclorura de etilenă ș.a.

Profesorul de biochimie B.N. Ames, de la Universitatea din California, care a elaborat *mutatestul* („tehnica de depistare a produselor susceptibile de a provoca mutații la microorganisme") estimează că substanțele care induc mutații în ADN-ul microorganismelor sînt cancerigene și teratogene pentru om. Dintre produsele cancerigene, 90% sînt mutagene.

Dacă amintim că diclorura de etilenă, care stă, alături de metan, la baza chimiei organice industriale (din petrol și gaz natural), este la originea a 45% din ansamblul produselor chimice manufacturate (în 1977, S.U.A. a vîndut 2 200 000 tone oxid de etilenă, plus alți acizi de alcene: etilenglicol, propilenglicol ș.a.) și că această substanță, așa cum s-a precizat, este mutagenă, se poate sesiza presiunea toxică uriașă la care este supusă plasma germinativă în societatea chimizată. Amintim că din petrol și gaz natural rezultă șapte substanțe de bază din care se edifică moleculele complexe ale petrochimiei. La cele două menționate, metanul și etilena, se adaugă: propena, butenele, butadienul, benzenul, toluenul și xilena. Or, după studiile C.I.R.C., pentru om oxidul de etilenă are acțiune limitat cancerigenă, în timp de benzenul are acțiune cancerigenă certă. Dar efectul cancerigen la șoareci și iepure a fost recunoscut abia în 1978. Înseamnă că în lume numai sub incidența cancerigenă — mutagenă a acestor două substanțe se găsesc în permanență zeci de milioane de oameni. Deci, dacă pentru depistarea acțiunii mutagene a unor compuși chimici care au apărut în mediul de viață al omului sînt necesari minimum 20—30 de ani, rezultă că pentru anii '80 și '90 se poate prevedea că în țările

industrializate va avea loc o recrudescență a cancerelor și defectelor congenitale, precum și o creștere a ratei mutațiilor genice.

Cercetătorii Universității din Toronto, Canada, au stabilit că schimbările cromozomale detectate la un grup de băieți în vîrstă medie de 14 ani se datorează inhalării accidentale de către aceștia a unor cantități relativ mari de solvenți clorurați și din hidrocarburi.

O mare atenție a fost acordată cercetării efectelor antibioticelor utilizate pe scară largă ca medicamente. S-a constatat astfel că cloramfenicolul produce anomalii cromozomale în culturile de celule de măduvă osoasă umană, precum și în culturile de limfocite. Antineomicina D, daunomicina și nogalamicina au indus mutații genice.

Substanțele sintetice utilizate ca medicamente anticanceroase: 6-mercaptopurina, bisulfanul, trietilentiofosforamida, derivații azot-iperitei și alții induc distrugerea cromozomilor și, ca urmare, inhibă proliferarea celulelor canceroase. Evident că ele trebuie administrate ca substanțe antimitotice pentru combaterea cancerului. La bolnavii tineri vindecați de cancer aceste substanțe pot induce schimbări genetice care apar la urmașii lor. De aici, necesitatea prudenței în alegerea metodei de combatere a cancerului. Derivații acridinei utilizați ca medicamente anticanceroase sau substanțe antiseptice (acriflavina, proflavina, 5-aminocridina), ca și coloranții pe bază de acridină, manifestă proprietăți mutagene față de unele microorganisme și față de multe specii de plante superioare.

De tulburări în stare să inducă cancere la stomac este suspectat nitritul de sodiu ($NaNO_2$), substanță amintită anterior. (În tubul digestiv, în urma unor reacții din nitriți se poate ajunge la N-nitrosodimetilamină — NDMA, care este cancerigenă). Efectele acestui adjuvant în conservarea alimentelor au fost amplu cercetate la Universitatea Columbia (S.U.A.) și la Institutul Max Planck (R.F.G.).

Cercetătorii americani au descoperit că prin hidroliza nitritului de sodiu rezultă acid azotos (HNO_2), care are proprietatea de a dezamina oxidativ bazele azotate din acizii nucleici: adenina, guanina și citozina, iar cercetătorii germani au dovedit că acidul azotic (HNO_3) induce mutații genice la viruși și bacterii. Deci, indirect, nitritul de sodiu

și direct acidul azotos și acidul azotic, derivați din prima substanță sau produși sintetic, induc în plasma germinativă efecte biologice (cancere, anomalii fenotipice) și efecte genetice (mutații genice, dislocații cromozomale, ploidie). Cu ce va fi substituit nitritul de sodiu? Cercetările viitoare vor preciza!

Băuturile alcoolice induc oare dereglări celulare? Fundația Națională de Științe a S.U.A. a anunțat în vara anului 1979, că în 6 din 7 sticle de whisky a fost găsită N-nitrosodimetilamină care este cancerigenă pentru animale. Se bănuiește că nitrosaminele cancerigene rezultă ca un subprodus al maltajului orzului, mai ales în timpul uscării malțului cu aer cald de la un foc fumegînd. NDMA a fost găsită în toate cele 18 mărci de bere studiate. În schimb, în vin, coniac, gin, vodcă, rom, nu s-a găsit NDMA. Sigur este că nici whiskyul și nici berea nu vor fi suprimate, cum nu poate fi suprimat tutunul responsabil pentru cancerul plămînilor. Sînt posibile însă perfecționări tehnologice capabile să înlăture sau să reducă pînă la doze subnocive substanțele cancerigene (de exemplu, prin uscarea malțului fără expunere la foc). Deocamdată trebuie să se știe că băutorii de whisky sînt expuși cancerului tubului digestiv după cum fumătorii sînt expuși cancerului plămînilor. Doza? Este în funcție de alți factori nocivi sau stresanți cumulați în mediu și de susceptibilitatea genetică a individului. Cînd se declanșează boala? Ca și în cazul altor factori cancerigeni, dereglarea în masă a diviziunilor celulare din diversele țesuturi și organe umane apare cu o întîrziere de 20—25 de ani.

Prezența în apă și alimente a unor metale peste o anumită doză poate fi dăunătoare organismelor din mediu și omului. Dintre acestea amintim mercurul, cuprul, zincul, cadmiul, plumbul.

De mercur este legată foarte „celebra" catastrofă din Minamata, Japonia, care a provocat moartea a mai mult de 200 de oameni, mii de infirmi, copii mutilați. Producția de mercur s-a multiplicat în corelație strînsă cu creșterea rapidă a producției de clor necesar în realizarea de substanțe chimice organice de sinteză (detergenți, pesticide etc.). Clorul rezultă în urma trecerii unui curent electric prin sare -NaCl (electroliza; în acest proces mercurul funcționează ca un

catod mobil conducînd electricitatea și captînd în amalgam sodiul). Mercurul încărcat cu sodiu reacționează cu apa: rezultă hidroxid de sodiu (soda poate conține pînă la 1% mercur) și mercur pur, dar și o mare cantitate de apă impurificată cu mercur. Acest amestec se elimină prin evaporație (din aer mercurul este readus pe sol de precipitații) sau ajunge în sistemul de evacuare a reziduurilor și apoi pe fundul rîurilor, a lacurilor, a golfurilor, unde se acumulează în sedimente, (în Marea Mediterană de exemplu sînt deversate anual circa 100 tone de mercur). Aici, bacteriile anaerobe convertesc, prin metilare, mercurul metalic (care este puțin asimilabil) într-o formă organică, solubilă, metil-mercurul (CH_3) Hg, asimilabil de către animale (pești, oameni; o parte, dimetilmercurul $(CH_3)_2Hg$, fiind foarte volatil, ajunge în atmosferă, contaminînd-o).

Metil-mercurul este unul dintre compușii cei mai toxici din lume (mercur se utilizează în cataliza transformării acetilenei în clorura de vinil și acetat de vinil, care servesc la fabricarea materialelor plastice, a acetatului de polivinil-adeziv, a acetataldehidei, la fabricarea tuburilor fluorescente-amestec de argon+vapori de mercur, a unor instrumente de control-termometre, în pictură, pentru impregnarea lemnului, a zidurilor pentru capacitatea sa fungicidă, în medicină — antiseptic, în fabricarea pesticidelor organomercurice, în industriile: textilă, hîrtiei, coloranților, cosmetică, extragerea metalelor prețioase, a explozibililor, în industria nucleară etc.).

Mercurul din cantitatea mare de reziduuri provenite de la atîtea industrii este imposibil de recuperat. În plus, are o mare difuziune în mediu, determinînd contaminarea directă sau indirectă a mii și sute de mii de oameni. Acest metal, prin metil-mercurul asimilabil, acționează ca un dușman: puternic, clandestin, producînd tulburări neurologice, nașteri anormale, distrugerea sistemului nervos a fetusului, anomalii cromozomice. Pentru oameni sursa principală de intoxicare cu metil-mercur o constituie peștii și crustaceele contaminate (precum și păsările acvatice).

Deci, apa galben-portocalie din aval de industriile menționate este o otravă violentă cînd depășește doza admisă (doza fixată de 0,2 μg la litru în S.U.A.; 0,3 μg/litru sau

0,3 ppm în Franța; apa nepoluată conține sub 0,1 μg/litru mercur). Or, unele știuci pescuite din Rhin conțineau 18 ppm mercur (părul unui pescar din regiunea Marsiliei avea un conținut de 11,70 ppm — părți de milion — mercur). Pentru a înțelege modul de acumulare a mercurului menționăm că dacă fitoplanctonul conține 10 pînă la 100 ppb (părți pe miliard — billion), zooplanctonul va conține de la 100 la 500 ppb, iar insectele și larvele lor vor conține de la 0,1 la 1 ppm. Peștii care se hrănesc cu insecte și zooplancton vor acumula o cantitate nocivă, de la 0,5 la 1 ppm, iar peștii carnivori vor atinge cel mai înalt nivel: 4 ppm mercur. Păsările din zonele contaminate absorb mercurul volatil depozitat pe cîmp din precipitații sau prezent în îngrășăminte, pesticide, semințe etc.

Cercetări recente au stabilit că unele bacterii fixează mercurul anorganic și-l introduce în vitamina B12, sintetizată de aceste bacterii. Prin reacția vitaminei B12 cu acidul N5 metiltetrahidrofolic are loc transferul grupului metil (CH_3) pe vitamina B12 pentru a forma un derivat stabil, metil — B12. Acest derivat, în mediu reducător, poate transfera grupul metil pe ionul de mercur, dînd naștere metil-mercurului. Ca urmare, se poate presupune că metilarea mercurului poate avea loc nu numai pe fundul apelor, ci și în organismul uman, în ficat (din care, de altfel, se extrage vitamina B12), mușchi, rinichi (dar și în albușul de ou), dacă mediul este poluat, iar omul inhalează vaporii de mercur. Așadar, omul, fără a consuma pește intoxicat cu metil-mercur, în mediu de mercur poate să sintetizeze și să acumuleze în corp doze toxice din această otravă generată de diverse industrii și substanțe bazate pe mercur.

Cadmiul și unii compuși, în doză mai mare de 10 μg/1, provenit din tutun, induce aberații cromozomice, pulmonare, enfizem, tulburări renale. Este posibilă asocierea cu cancerul prostatei. Produce carențe în Ca, Zn și proteine, în vitaminele C și D.

Plumbul, care este periculos în doză de peste 50 μg/l, poate proveni în mediu din arderea benzinei în automobile, din instalații casnice de plumb, pictură cu plumb ș.a. În benzina cu cifră octanică înaltă, în scopul eliminării detonației care reduce puterea motorului, s-a impus adăugarea unei

cantități de tetraetil de plumb. Cu cît a crescut raportul mediu de compresiune, cu atît a trebuit ridicat conținutul de plumb al benzinei (față de conținutul inițial cantitatea de plumb aproape s-a dublat). Plumbul, care este toxic, se degajează în aer prin țeava de eșapament (în emisiile de hidrocarburi prin eșapament există și alte impurități toxice — monoxid de carbon — care în cantitate de 30 ppm în interval de 8 ore reprezintă un nivel „grav", și — oxizi de azot — dintre care bioxidul de azot este foarte toxic, chiar letal, prin distrugerea celulelor pulmonare. Nivelul acceptabil, pentru expuneri de scurtă durată — o oră — este de 2 ppm; 1 ppm bioxid de azot este toxic pentru plante). În orașele mari cu multe automobile, de-a lungul autostrăzilor folosite intens și în preajma unor industrii care folosesc plumb, concentrațiile mari de plumb provoacă într-o primă fază oboseală, apatie, iritabilitate, dureri de cap și apoi encefalopatie, comă și moarte; la intoxicația cronică — saturnism — au loc printre altele schimbări în hematii, inhibarea sintezei hemului, scleroza renală, alterarea funcțiilor hepatice și tiroidiene etc. Metalul este și teratogen inducînd modificări ale creierului fetușilor.

Cuprul, în doză peste 1 mg/l de apă, provenit din erodarea țevilor unor instalații, provoacă, într-un stadiu incipient, gust metalic neplăcut în gură, vomă, dureri de stomac, diaree. Într-un stadiu avansat produce icter, hemoliză (distrugerea globulelor roșii), hemoglobinurie, hematurie și oligurie (reducerea volumului de urină eliminat). Se presupune că prezența cuprului accentuiază potențialul mutagenic al unor substanțe.

Zincul, în doză peste 5 mg/l, poate cauza anemie, iar dozele mari pot leza plămînii provocînd moartea. Intoxicațiile cu aluminiu din alimente, ustensile, accidente, declanșează demența senilă, care constă în alterarea precoce a funcțiilor cerebrale. Aluminiul se fixează în neuroni, determinînd degenerarea neurofibrilelor cerebrale; apar crize de epilepsie, afazie (pierderea vorbirii), agnozie (pierderea capacității de recunoaștere) ș.a. În lipsa aluminiului această boală (boala lui Alzheimer) apare între 40 și 60 de ani, însă la doze mari de aluminiu ea se poate instala la orice vîrstă (cînd concentrația aluminiului din neuroni este de peste 12 ori superioară mediei, care este de 2 milionimi de gram per gram).

Atenţie la iradiere!

Capacitatea mutagenă a razelor X a fost descoperită cu mai bine de 50 de ani, de H.J. Muller (în 1927), la *Drosophila melanogaster*. Cercetările ulterioare au relevat faptul că aceste radiaţii induc mutaţii genice şi aberaţii cromozomale la toate organismele vii, deci şi la om. Între timp au fost descoperite noi radiaţii, inclusiv energia atomică şi nucleară, au crescut sursele de radiaţii, s-au extins mult utilizările radiaţiilor, mai ales în scopuri militare, dar şi în scopuri ştiinţifice şi industriale, inclusiv în generarea electricităţii, practic, principala utilizare paşnică a energiei nucleare.

După cumplitul eveniment al bombardării atomice din Japonia, din august 1945, puterile atomice şi nucleare, în special, au înmulţit exploziile experimentale. Numai în 1951, au fost detonate 29 de bombe. În afară de amploarea capacităţilor distructive ale exploziilor alte efecte nu erau studiate de experimentatorii militari şi politici. În limbajul acestora nu exista noţiunea de risc nuclear civil. A fost necesară o întîmplare pentru studiul şi răspîndirea radiaţiilor: în aprilie 1953, în urma unei ploi torenţiale, căzută în statul New York, nişte fizicieni au constatat o creştere bruscă a nivelului radiaţiilor în mediu, în special de stronţiu radioactiv (Sr 90) şi iod radioactiv (I 31). Descoperind că sursa o constituia apa de precipitaţii care era foarte radioactivă, aceşti fizicieni au ajuns la concluzia că provenienţa o constituia exploziile nucleare efectuate în Nevada, de unde reziduurile radioactive au fost purtate de vînt pînă în statul New York, unde ploaia torenţială le-a adus pe sol. Deşi s-a căutat să se păstreze secretul acestei constatări, curînd fizicienii de pe întreg teritoriul S.U.A., mai mult sau mai puţin discret, au început să determine radioactivitatea din aer, apă, praf, sol, alimente. Rezultatul? Acestea erau contaminate radioactiv din căderea reziduurilor exploziilor atomice. Se ştia însă că radiaţiile se cumulează în organism, că au efecte biologice distructive asupra organismelor vii şi efecte genetice asupra urmaşilor.

Stronţiul 90 din reziduurile radioactive, fiind asemănător cu calciul, circulă în mediu împreună cu acesta. Astfel, o dată cu extragerea de către plante din sol a calciului necesar în mitoză, în diviziunea cloroplastelor, în sinteza protidelor etc. este extras şi stronţiul 90 (în cenuşa plantelor, care reprezintă, în medie, la cereale şi leguminoase pentru boabe 1 — 5 % din substanţa uscată, oxidul de calciu, CaO, reprezintă în seminţele de secară şi mazăre: 2,94 %, respectiv pînă la 8 %, iar în tulpinile de secară şi mazăre: 8,20 %, respectiv, 38,82 %. Frunzele de tutun şi ceai conţin 36,02 %, respectiv 14,82 %, iar boabele de cafea şi struguri 6,29 %, respectiv 10,77 % CaO în cenuşă). Însoţind calciul în plante cerealiere, în leguminoasele pentru boabe, în gramineele şi în leguminoasele furajere, în frunzele de tutun şi ceai, ca şi în boabele de strugure şi cafea etc., stronţiul radioactiv ajunge în alimentaţia umană direct prin intermediul legumelor, fructelor, vinului, cafelei, pîinii şi indirect prin intermediul laptelui, ouălor şi cărnii.

În organismul uman stronţiul radioactiv se acumulează în jurul osteocitelor care, sub influenţa radiaţiilor, se pot transforma în celule canceroase, cu precădere la copii. Iodul radioactiv emite raze β şi γ. Iodul normal intervine în funcţia glandei tiroide, intrînd în compoziţia hormonilor tiroidieni. Iodul 131 se depune în glanda tiroidă, inducînd neoplasm tiroidian.

În mediul extern şi intern al omului, în animale, plante, microorganisme, radioactivitatea artificială se acumulează ca o consecinţă a diverselor emisii radioactive. Astfel, populaţia umană este expusă unor riscuri tot mai mari din partea radiaţiilor sau a unor substanţe toxice. Se apreciază că orice expunere la radiaţii, oricît de mică ar fi ea, implică un anumit risc genetic, sub forma mutaţiilor genice, a anomaliilor cromozomale şi biologice sub forma cancerului. Nu există expuneri absolut inofensive la radiaţii, orice cantitate de radiaţii poate afecta sănătatea victimei, scurtînd viaţa, producînd cancer sau perturbări genetice. S-a verificat că radiografierile aplicate mamelor în primele trei luni de sarcină sporesc de 16 ori riscurile cancerului pentru copil în stadiul de fetus (din perioada de embrion la naştere).

Într-o serie de ţări au fost construite centrale electrice nucleare. Spre deosebire de termocentralele care folosesc cărbuni, gaz metan, petrol, centralele nucleare nu produc pulberi şi bioxid de sulf, în schimb deşeurile rezultate în lipsa depozitării corespunzătoare pot deveni poluanţi radioactivi.

Zece ani de observații au dus la concluzia că dozele de radiații considerate „permisibile" provoacă după un timp îndelungat o creștere progresivă a numărului anomaliilor cromozomale detectabile microscopic, de exemplu, în nucleul celulelor albe ale sîngelui. Un asemenea studiu a fost efectuat în Marea Britanie asupra unor muncitori (197) care lucrau în docuri la încărcarea periodică cu combustibil a submarinelor nucleare (testările citologice au fost efectuate anterior angajării și după 10 ani de muncă). Analizele au relevat că aberațiile cromozomice sînt direct proporționale cu doza de radiații primită de cele 197 persoane cercetate. Înainte de expunere numărul aberațiilor a fost de 1 la 700 celule cercetate; la o doză de radiații ionizante de 25 sau 30 de *remi*[1], primită de-a lungul anilor, numărul aberațiilor cromozomale a fost de 1/175 celule cercetate. Numeroase aberații erau letale pentru celule, altele se prezervau prin diviziuni celulare.

La acești muncitori au fost cercetate microscopic doar celule albe ale sîngelui, care nu participă la reproducere și nu au fost cercetate celule-mamă ale gameților sau gameți. Se știe însă că energia radiațiilor pătrunde în toate țesuturile determinînd ionizarea apei din ele și disocierea moleculelor acesteia în ioni electrici schimbați. Ionii cedează energia lor macromoleculelor de care se leagă, inclusiv de moleculele de ADN, din a căror segmente sînt formate genele posesoare ale informației genetice. În acest mod au loc schimbări care induc mutații genice, atît somatice, cît și germinale, ce însă nu sînt detectabile microscopic, ci numai funcțional. Cînd dozele de radiații sînt mai mari, ele pot induce ruperi în cromozomi, detectabile microscopic. Unele dintre ele pot fi atît de profunde încît cauzează dereglări metabolice incompatibile cu viața celulei, a țesutului, organului și chiar a individului supus iradierii.

Mutațiile genice induse de radiații, ca și de agenți chimici mutageni, în proporție de 80%, sînt dăunătoare, iar 19% sînt letale pentru organismul în care apar (între acestea pot fi

[1] Energia transferată de radiații este măsurată în *razi;* radul este echivalentul a o sută de *ergi* transmiși unui gram de țesut iradiat. Pentru comoditate, cînd se examinează efectele nocive ce pot rezulta în urma unei expuneri la radiații ionizante se utilizează noțiunea de *rem* pentru a exprima doza primită de țesuturi. Remul este echivalent unui rad (în cazul radiațiilor gamma, beta sau X).

incluse și mutațiile somatice care cauzează cancerizarea celulelor). Mutațiile apărute în celulele mamă ale gameților din testicule și ovare, în urma fecundării se transmit descendenților care vor manifesta, datorită schimbării informației ereditare și a codului genetic, în anumite condiții (homozigoție, dominanță) efectul dăunător sau letal al mutației genice, la nivel de zigot, embrion, fetus, copil nou născut, adolescent sau adult.

După unii experți, dozele de aproximativ un rem pe an sînt prea slabe pentru a provoca aberații cromozomice periculoase. Pe plan internațional, în 1956, s-a acceptat că pentru muncitorii expuși zilnic la radiații ionizante doza permisibilă maximală este de 5 remi pe an primită în doze mici, care să nu depășească doza de 2,5 remi într-o singură priză. Deoarece norma de 5 remi/an este totuși mare și cumulativă, în 1977 se considera că expunerile la radiații trebuie să fie menținute la un nivel atît de slab pe cît este „rezonabil posibil".

Un studiu amplu asupra a 35 000 muncitori, de la centrul nuclear de la Hanford, S.U.A., efectuat de echipa de cercetători Mancuso, Stewart și Kneale, comunicat în 1976, a relevat că doze de radiații infinit de slabe pot declanșa cancer. Astfel, la o doză cumulată, mai mică de 0,08 rad /om (doză de trei ori mai mică decît cea emisă la o microradiografie a plămînilor, morții de cancer au reprezentat 19,3%, la doza între 0,32 la 0,64, morții de cancer au reprezentat 21,8%, iar la doza rad/om între 2,56 și 5,11, morții de cancer au ajuns la 24,6% (menționăm echivalentul dozelor în remi administrate în radiodiagnostic: radioscopie pulmonară — 5,5, radiografie pulmonară — 2, stomac — — 4 la 6, urografie intravenoasă — 4,5 bazin — 0,1 la 1,5, șold — 0,03 la 3,2 etc. Doza de 50 de remi produce oboseală generală, 100 remi induce sterilitate și cancer în masă, 300 remi omoară 10% din iradiați, 400 de remi reprezintă doza letală pentru 50% din iradiați.

Potrivit regulei preconizate de C.I.P.R. (Comisia Internațională de Protecție Radiologică), pentru ansamblul unei colectivități, iradierea nu trebuie să depășească în medie o zecime din doza maximală admisibilă (deci sub 0,5 rem/an/om).

Manifestarea clinică a efectelor radiațiilor în doze mici nu apar imediat, ci mult mai zîrziu, uneori la 10, 20 sau 30 de ani de la iradiere, iar transformarea sub influența iradierii a unei singure celule poate să fie de ajuns pentru declanșarea unei tumori.

O veste bună primită de la Institutul Elvețian de Cercetări Nucleare (S.I.N.): o subparticulă atomică — „pionul" — reprezintă o nouă armă în terapia cancerului. Țintit asupra tumorilor, pionul induce „explozia" prin ionizare a celulelor bolnave. Pionul („mezonul π") are o masă în medie de 270 ori mai mare aceleia a electronului și o durată de viață de 0,02 milionime de secundă. Fasciculele de pioni pot fi concentrate precis asupra unui volum mic corespunzînd unei tumori interne, fără a leza țesuturile sănătoase aflate în traiectoria particulelor (spre deosebire de razele X care dispersează o mare parte din energia lor de-a lungul întregului parcurs în organism). În tumoare, respectiv în celulele canceroase, pionul explodează în fragmente nucleare de energie înaltă (mai ales neutroni, dar și protoni, particule alpha și alte fragmente subatomice), spărgînd atomii și moleculele din vecinătate, care reprezintă tocmai constituienții celulelor canceroase. Dotarea unor spitale cu aparate perfecționate care să producă fascicule de pioni suficient de puternice va ridica sensibil efeciența pion-terapiei aplicată pacienților canceroși (ciclotronul de cercetare al S.I.N. accelerează protonii pînă ating energia de 590 MeV).

Cum devin cancerigene unele substanțe chimice?

Din prezentarea anterioară se desprinde faptul că marea majoritate a cancerelor sînt induse cu precădere de substanțele chimice de sinteză și de radiațiile din mediu. De exemplu, benzenul (C_6H_6), utilizat ca solvent al lipidelor (și ca urmare în pictură) produce cancerul măduvei osoase; clorura de vinil, utilizată în industria materialelor plastice, ca și aflatoxinele (produse de un mucegai dezvoltat pe arahide) produc cancer la ficat; produsele de piroliză ale triptofanului și lizinei, existente pe cărnuri și pești prăjiți pe grătar, produc cancerul stomacului; hidrocarburile policiclice aflate în gudroanele fumului de țigaretă produc cancerul pielii, bronșiilor, vezicii urinare etc.

Numeroase cercetări de laborator (Elisabeth și James Miller, 1947, S.U.A.; M. Daune și R. Fuchs, 1980, Franța și alții) au arătat că substanțele chimice nu sînt, ca atare, cancerigene. Ele pot deveni cancerigene în organism căpătînd o structură moleculară particulară, ce deregleză funcționarea electronică și biologică a unor celule (s-a demonstrat că la animale la originea cancerelor stau virușii; la om, o asemenea origine nu a fost probată niciodată cu certitudine). În susținerea ideii că substanțe banale pot deveni cancerigene în corp s-a plecat de la observația că aminele (derivați organici ai amoniacului — NH_3, în care atomii de H sînt înlocuiți prin radicali organici: $R—NH_2$ — amine primare, R_2NH — secundare, R_3N terțiare) și amidele aromatice (în care hidrogenul amoniacului este substituit cu un rest de acid organic, rezultînd gruparea amidică — $CO.NH_2$; amide primare: $R—CO.NH_2$, secundare — imide: $(R—CO_2)NH$ și terțiare: $(R—CO)_3N$. În urina normală este eliminată zilnic o cantitate de 50—100 mg N amidic; nu induc sistematic tumori decît în ficat și vezica urinară (cînd acești compuși sînt administrați animalelor: oral, intravenos sau intraperitoneal). Faptul sugerează că substanțele chimice trebuie să se modifice în ficat și vezică, dînd naștere unor „metaboliți ultimi", care au acțiune cancerigenă. Cercetările experimentale continuă.

Metaboliții devin foarte electrofili în urma pierderii de către un atom din molecula lor a unui electron. Ca urmare, acest atom este capabil să reacționeze cu poziții nucleofile, adică cu atomi bogați în electroni, în general, cu atomi de azot și de oxigen. În celulă însă asemenea poziții nucleofile există în moleculele de ADN din gene. Deci, metaboliții ultimi, electrofili cancerigeni, se leagă de ADN, nucleofil. De exemplu, metabolitul N-acetoxi — N-2-acetilaminofluoren (AAAF), rezultat din acetilaminoflouren (prin sinteză chimică sau prin incubare cu fracții celulare de ficat de șobolan), se fixează pe baza azotată guanina-G, din ADN, fie pe atomul de carbon nr. 8, fie pe atomul de azot nr. 2.

Pentru relevarea acestei reacții în laborator, pe animale, ADN-ul a fost incubat cu AAAF și diferite nucleaze (pentru denaturare și depolimerizare în nucleotizi: bază azotată + pentoză + radical fosforic și nucleozizi = bază azotată +

pentoză, precum și radicali fosforici). După incubare, cu ajutorul cromatografiei au fost separați nucleozizii normali: adenozin, guanozin, citidin și timidin, de nucleozizii legați de AAAF. Analiza a relevat că numai guanozina reacționează cu metabolitul cancerigen (în pozițiile C8 și N2). Drept rezultat, *in vivo*, molecule bicatenare helicoidale de ADN din cromozomi se modifică la nivelul unor poziții ocupate de guanină. Este indusă astfel o mutație somatică ce determină o separare și sinteză anarhică a moleculelor de ADN din anumite celule, care se divid necontrolat producînd o tumoare care se formează doar în cazurile în care AAAF se fixează pe guanozine situate în cele cîteva gene (aproximativ 10) care controlează diviziunea celulară (în cei 46 de cromozomi ai unei celule umane, lungimea bicatenei de ADN ajunge la 2 metri, iar numărul genelor, care reprezintă segmente de ADN, la cîteva zeci de mii).

În cazul AAAF ținta pentru fixare în ADN din genă este reprezentată de baza azotată guanina. În corp pot ajunge însă numeroase alte substanțe care produc „metaboliți ultimi" cancerigeni. Pentru aceștia drept ținte de fixare pot fi celelalte trei baze azotate din ADN și anume: adenina (care în bicatena de ADN se împerechează obligatoriu numai cu timina), timina (care se împerechează cu adenina) și citozina (care în bicatena de ADN se împerechează obligatoriu numai cu guanina; guanina formează pereche numai cu citozina). Or, prin fixarea preferențială a metabolitului cancerigen de o anumită țintă-bază, aceasta nu mai poate realiza împerecheri normale: A-T sau T-A și G-C sau C-G, ci împerecheri greșite (de exemplu, guaninele cu AAAF se împerechează cu timina și nu cu citozina) care determină apariția la nivelul dat al moleculei de ADN, deci într-o anumită genă, a unui segment de ADN mutant. Și astfel, dacă ADN-ul mutant se află în gena responsabilă pentru controlul diviziunii va face ca aceasta să piardă proprietatea de control, iar celula afectată (ca și celulele-fiice care sînt identice genetic cu celula-mamă) se va divide haotic producînd cancer.

Așadar, mutațiile somatice induse de diverși metaboliți sînt responsabile pentru formarea tumorilor. Este util de reținut că în ADN pot apărea numeroase erori în replicare

determinînd transcripția unor mesaje genetice aberante. Acțiunea unora dintre genele mutante poate rămîne înhibată de gene înhibitoare sau epistatice, sau poate fi restaurată pînă la normal de gene supresoare; alte gene mutante pot avea efecte letale asupra celulei în care apar.

În celule există un mecanism de reparare enzimatică a defectelor în structura normală a ADN. Mecanismul de restaurare a secvenței normale de baze azotate este eficace cînd acționează anterior replicării catenei schimbate de ADN.

...Materiale plastice împotriva cancerului

Din 900 000 substanțe testate în 30 de ani, 40 sînt active împotriva cancerului, inclusiv unele materiale plastice folosite curent la acoperirea serelor, la confecționarea unor proteze, legături etc. inerte chimic. Prima substanță din acest grup de materiale plastice, numită ciclofosfazen, a fost sintetizată în Germania încă în 1834, de Rose și Liebig, prin acțiunea pentaclorurei de fosfor — PCl_5 asupra clorurii de amoniu — NH_4.

Activitatea anticanceroasă a plasticului a fost descoperită (și brevetată în 1979) de un grup de cercetători francezi, condus de dr. J.F. Labarre, de la Universitatea din Toulouse. Aceștia au pus la punct două droguri autitumorale active în cancerele induse la șoareci, șobolani, cîini și maimuțe. Primul drog are o capacitate anticanceroasă remarcabilă în 21 de tumori animale, iar al doilea, înrudit cu primul, s-a dovedit eficace în toate cele 30 de diferite tipuri de tumori animale induse. Urmează ca aceste droguri cu acțiune certă anticanceroasă la animale să fie testate farmacologic și toxicologic la om (la care au fost descoperite 104 tipuri de tumori. Este necesară precizarea că spre deosebire de celula normală, celula canceroasă prezintă la suprafață numeroase orificii continuate cu canalicule, care îi dă aspect de burete. Ca urmare, celula canceroasă este mult mai permeabilă, inclusiv pentru diverse droguri, comparativ cu celula sănătoasă. Prin canalicule, drogurile ajung pînă la nucleu și la cromozomi, în care se află acidul dezoxiribonucleic — ADN și genele implicate în cancerizare).

Noua familie de produse, a căror molecule (936 molecule existente) sînt numite ciclofosfazene, utilizate, peste 10 ani, în cercetări fundamentale privind chimioterapia cancerului, posedă două particularități structurale majore care le conferă potențialități antitumorale. Prima particularitate: „numărul magic" stabilit de Barnett Rosenberg; a doua, o bazicitate a atomilor lor de azot printre cele mai ridicate din natură.

„Numărul magic" indică distanța de 3,3 ångstromi (Å), care separă cei doi atomi de clor din molecula de cis-platinum (PDD alcătuită din platină Pt, doi atomi de clor-Cl și două molecule de amoniac-NH_3: $(NH_3)_2PtCl_2$ PDD descoperită de Rosenberg, în S.U.A., în 1969, se numără printre cele mai eficace droguri antitumorale folosite în clinici. Activitatea antitumorală cu totul remarcabilă a PDD este conferită tocmai de distanța de 3,3Å dintre atomii de Cl, care este egală cu distanța dintre două spire ale bicatenei helicoidale a moleculei de ADN. Mai precis, între două poziții a ADN bogate în electroni, situate la nivelul atomilor de azot a două molecule de guanină, una pe o spiră, alta pe cea următoare (dispuse paralel cu axa moleculei de ADN). În cazul ADN aberant, din celulele bolnave, moleculele de PDD, prin cei doi atomi de clor, fixează prin două legături chimice puternice (prin dialchilare: eliminarea din fiecare moleculă de guanină a cîte doi atomi de H, de pe atomul de azot nr. 2) cele două spire ale bicatenei de ADN. Datorită celor două duble legături chimice, moleculele de ADN din celulele tumorale sînt împiedicate să se despiralizeze și, deci, să funcționeze (nu mai realizează transcripția și replicarea). Astfel, celulele canceroase în prezența PDD, urmare a reacției „numărului magic", sînt inhibate de a se divide, fapt care le cauzează moartea, determinînd o regresie a tumorilor.

Medicamentele antitumorale pot bloca moleculele de ADN din celulele canceroase și printr-un alt mecanism și anume: prin intercalarea în interiorul moleculei bicatenare helicoidale de ADN între perechile de baze azotate (A—T și G—C), mai precis, între plăcile formate de legăturile de hidrogen care țin împreună cele două catene (trei punți de H între G—C și două punți de H între A—T). Drogul și ADN-ul reacționează prin realizarea unor legături chimice de „tip hidrogen", care sînt cu atît mai puternice cu cît atomii de azot sau oxi-

gen ai moleculei antitumorale intercalate sînt mai bazici, adică mai avizi de hidrogen. Prin intercalare între plăci, drogurile antitumorale produc o distorsionare a bicatenei de ADN care inhibă multiplicarea ADN, respectiv, a celulelor bolnave, fapt care determină regresia tumorii.

Studiul moleculelor de ciclofosfazen, realizat de echipa condusă de Labarre, a relevat că unele dintre acestea au atomii de clor dispuși la distanța particulară de 3,3Å, iar altele posedă o bazicitate ridicată (dovada bazicității a fost dedusă prin studiul electronomicroscopic a unei bucle (îngroșări) circulare în bicatena de ADN, în absența și, apoi, în prezența ciclofosfazenelor. În absența drogului, bucla măsura 3,5 microni, iar în prezența drogului bucla depășea 4 microni. Creșterea mărimii buclei, care depășește dimensiunile normale ale bicatenei helicoidale de ADN, a fost considerată ca o indicație a intercalării moleculei ciclofosfazenei utilizate între plăcile formate de punțile de hidrogen dintre două perechi de baze succesive din ADN. Din cele aproape o mie de molecule de ciclofosfazene studiate în laborator, în urma testării pe animale cu cancere induse au fost reținute pentru acțiunea lor antitumorală: două datorită „numărului magic", iar patru datorită „bazicității ridicate".

Analiza reacției ciclofosfazenă-ADN a evidențiat faptul că acest drog prin doi atomi de clor (din 6) distanțați la 3,3Å se fixează pe două molecule de adenină-A, plasate în linie pe două spire alăturate din ADN (nu pe guanină ca PDD). În interiorul bicatenei helicoidale de ADN, ciclofosfazenele caracterizate prin bazicitate ridicată se intercalează între două plăci hidrogenice formate între două perechi succesive de adenină-timină (A=T). În ambele cazuri drogurile inhibă realizarea funcțiilor de către ADN (sinteză proteică și replicare) determinînd moartea acestuia și a celulei canceroase.

Împotriva a două cancere ale sîngelui (leucemiile P 338 și L 1210) și a unei tumoare pigmentare (melanomul B_{16}) la șoarecele femelă, cele două ciclofosfazene cu număr magic s-au dovedit mijlociu de active antitumoral, în timp ce cele patru cu bazicitate puternică au manifestat o activitate antitumorală foarte semnificativă. Dintre cele bazice, cea mai eficace împotriva cancerelor induse a fost hexaziridino-

ciclofosfazena $N_3P_3A_{z6}$, denumită Myko 63. Myko 63 a dovedit o activitate antitumorală semnificativă determinînd remisiunea pînă la vindecare a 25 de tipuri de tumori induse la animale (nu are sau are puține efecte secundare, printre care acelea că atacă și celule sănătoase și că induce o toxicitate cumulativă). Prin substituirea treptată din Myko 63 a atomilor de fosfor cu sulf s-a obținut o moleculă mai puțin stabilă SOA_z, fără toxicitate, dar care este activă împotriva tuturor celor 30 de tumori induse la animale.

În prezent cercetătorii francezi examinează un medicament din generația a treia care va cumula ambele proprietăți majore antitumorale: numărul magic și bazicitate foarte mare. Se apreciază că cele două droguri: Myko 63 și SOA_z, manifestă activitate antitumorală universală (față de cancerele induse la animale) datorită flexibilității lor moleculare deosebit de mare care le permite să se adapteze în diferite moduri, asemenea unui passe-partout molecular, ansamblului de „mecanisme" responsabile pentru cancerizare.

Brevetul francez[1] pentru medicamentul antitumoral SOA_z s-a extins în 30 de țări, inclusiv în Japonia, care a cumpărat licența (în 1980). Firma japoneză Otsuka din Osaka a produs, în mai puțin de două luni, 50 kg de substanță (față de 900 mg produsă în Franța). Se speră că această substanță va putea fi folosită ca medicament și în cancerele umane.

Societatea la răscruce

Acest capitol a început cu prezentarea trăsăturilor „agriculturii tradiționale", care permitea realizarea unor producții vegetale și animale relativ mari, igienice și care asigura conservarea solurilor, a terenurilor de pășunat și continua refacere a fertilității solului, contribuind la o echilibrată creștere economică. Dar o dată cu necesitățile crescînde de hrană, pentru o lume în continuă creștere, trecerea agriculturii, începînd mai ales din anii '50, la chimizare, mecanizare, irigare și utilizarea unor soiuri ameliorate specializate, ca și separarea fizică a animalelor de sol prin creșterea în

[1] Rossion P.: *Des plastiques contre le cancer*, în „Science et Vie", Nr. 764, V, Paris, 1981.

combinate, a determinat o schimbare radicală a tehnologiilor de producție, care o dată cu creșterea recoltelor s-au îndepărtat tot mai mult de procesele naturale, transformîndu-se într-o „industrie agricolă". Acest tip de exploatare a devenit tot mai dependent de industrie. Ca urmare, agricultura și zootehnia și produsele lor, ca și mediul în general, au devenit tot mai poluate, prezentînd riscuri mari atît pentru echilibrul vieții, cît și pentru viața individuală și a speciei umane.

În plus, acest tip de agricultură, oricîte chimicale s-ar administra, se pare că se apropie deja de nivelul maxim ce poate fi atins de producții...

VI

ESTE REALIZABILĂ O PRODUCȚIE AGRICOLĂ RIDICATĂ MAI IEFTINĂ ȘI MAI CURATĂ?

Capitolul precedent și mai ales ultimul paragraf îndeamnă la meditație. Pentru ca societatea să prospere economic și să supraviețuiască biologic este necesar ca industria, transporturile, agricultura și alte activități umane utile să țină seama în mod hotărît și de cerințele ecosistemului. Natura trebuie considerată un aliat prețios al omului, deosebit de harnic și de fecund. Ea creează, întreține și protejează viața. Aceste funcții ale naturii se pot manifesta integral doar în condițiile ocrotirii și păstrării ei nealterate. O asemenea stare s-ar putea realiza, în primul rînd, prin analiza critică și reproiectarea tehnologiilor productive actuale defectuoase din punct de vedere ecologic, precum și prin reorganizarea unora dintre activitățile industriale și agricole poluante. În al doilea rînd, este necesar ca cercetarea științifică să creeze tehnologii noi bazate pe principii biologice, eficiente economic și nepoluante, să contribuie la realizarea unei agriculturi moderne, care să îmbine armonios tradiția, rezultatele pozitive ale agriculturii convenționale (chimice) și cerințele agriculturii biologice sau organice.

În societatea contemporană nu poate fi vorba de a se renunța complet la tehnologiile care se aplică acum. În prezent și în perspectivă, creșterea producției agricole și zootehnice este o condiție a supraviețuirii. Condițiile actuale arată că belșugul de cereale, carne, unt are un rol însemnat în prosperitatea unei țări, a unui popor.

Bazată tocmai pe această realitate, noua revoluție agrară din România, în contextul continuării dezvoltării industriei

și chimiei (care se vor dezvolta în proporții raționale: producția netă industrială se va dezvolta între 1981—1985 cu un ritm mediu anual de 8,8%) are ca principal obiectiv sporirea producției agricole și zootehnice, o dată cu creșterea eficienței economice. Creșterea producției globale agricole, în 1985 față de 1980, cu 27,4% (calculat pe o perioadă de 5 ani, cu o medie anuală de 4,5—5,0%) și realizarea în 1985 a 28 500 000 tone cereale boabe, 4 000 000 tone carne în viu, 86 700 000 hl. lapte de vacă ș.a., impune continuarea procesului de extindere în producția agricolă a unora dintre tehnologiile actuale de producție. Printre altele, în întregul cincinal agricultura va primi 11 640 000 tone îngrășăminte chimice substanță activă (din care 1 700 000 t s.a. în 1981 și aproximativ 3,0 mil. t s.a. în 1985), 290 000 t s.a. pesticide (din care 51 000 t s.a. în 1981, și aproximativ 70 000 t s.a. în 1985), precum și tractoare, combine și alte mașini și utilaje agricole, iar suprafața amenajată pentru irigații va ajunge la 2 900 000 ha (suprafața arabilă în cultură, în 1985, va fi de cel puțin 10 mil. ha.). În același timp agricultura va primi noi soiuri și hibrizi vegetali, ca și rase noi de animale.

Alături de organizarea bazei tehnice materiale necesare realizării prevederilor privind producția agrozootehnică, în țara noastră sînt luate și măsuri menite să determine diminuarea efectelor nocive ale pesticidelor asupra oamenilor și mediului ambiant. Menționăm, printre altele, recenta „Lege privind protecția plantelor cultivate și a pădurilor și regimul pesticidelor". Cum reiese din comunicatul ședinței Comitetului Politic Executiv al C.C. al P.C.R. din 18 septembrie 1982, în elaborarea acestui act juridic s-a avut în vedere că sporirea permanentă a producției agricole, ca și ridicarea potențialului productiv al pădurilor impun asigurarea unei protecții corespunzătoare a plantelor cultivate și a pădurilor împotriva dăunătorilor, bolilor și buruienilor, introducerea și generalizarea unui sistem integrat de prevenire și combatere a acestora prin îmbinarea mijloacelor chimice cu cele biologice, fizico-mecanice și agrofitotehnice, precum și prin crearea unor soiuri de plante rezistente la boli și dăunători. La întocmirea legii s-a ținut seama, totodată, de faptul că organizarea și desfășurarea, pe baze științifice, a întregii activități de protecție

a plantelor cultivate și a pădurlor trebuie să asigure, pe lîngă sporirea cantităților de produse agroalimentare și calitatea corespunzătoare a acestora, evitarea pierderilor, apărarea sănătății populației, menținerea calității solului, protecția mediului înconjurător.

În continuare prezentăm rezultate ale cercetării științifice care pot constitui premise ale dezvoltării unei producții agricole ridicate, mai ieftină și curată. Trăsătura esențială a unei asemenea agriculturi va consta în reproiectarea genetică a actualelor plante cultivate, în scopul ridicării capacității de producție și de adaptare la mediu, precum și în reducerea substanțială a cantităților de îngrășăminte chimice azotate prin transferul în genotipul plantelor neleguminoase: cereale, plante tehnice, legume, a genelor pentru asimilarea azotului liber din aer.

PERSPECTIVELE UNEI AGRICULTURI ECOLOGICE

Mai devreme sau mai tîrziu, dar cu atît mai devreme cu cît producția agricolă și zootehnică se va intensifica pe baza actualelor tehnologii, datorită efectelor negative ale acestora asupra mediului și omului, se va impune trecerea treptată la noi tehnologii care respectă procese din natură. În nici un caz nu va fi o reîntoarcere la agricultura tradițională. Noua tehnologie va fi orientată, pe de o parte, pe utilizare la maximum a unor procese naturale sau imitarea unor procese naturale, menite să contribuie la refacerea și îmbunătățirea structurii și fertilității solurilor, la eliminarea intoxicării acestora, iar pe de altă parte, la crearea unor soiuri și hibrizi vegetali cu unele trăsături deosebite. Creșterea animalelor, în unele privințe, este necesar să fie legată de cadrul natural, iar industria chimică prin creațiile sale se va subordona intereselor și cerințelor determinate de noul curs al producției agricole bazat pe tehnologii eficiente, dar cît mai puțin poluante.

Să restituim solului bogăția împrumutată de la el

În capitolul precedent s-a subliniat că îngrășămintele chimice și apa de irigat sporesc recoltele, insecticidele și fungicidele le apără, iar erbicidele ridică sensibil productivitatea muncii. În aceste condiții, rolul soiului se estompează, iar solul de cultură devine din ce în ce mai mult un suport în care viața normală s-a deteriorat, iar conținutul de humus se epuizează.

Esențialul în procesul de asanare a solului și igienizare a agriculturii, deci pentru a le face productive și sănătoase, este necesar ca în viitor să se realizeze condiții fiziologice normale pentru viața solului, prin eliminarea sau reducerea factorilor nocivi reprezentați mai ales de substanțele chimice de sinteză, care nu pot fi biodegradate și care deteriorează structura solului. Obiectivul poate fi atins doar prin refacerea în diversele soluri a cantităților de humus pe care ele le-au avut în momentul aplicării cantităților masive de îngrășăminte cu azot și pesticide sintetice. Acestea au inhibat, alterat genetic sau au omorît microflora biosintetizantă care realiza fertilizarea naturală a solului. Asigurarea humusului în soluri nu numai că le îmbogățește în azot organic necesar creșterii plantelor, dar creează și acea stare fizică a solului, care permite plantelor să folosească eficient substanțele nutritive, inclusiv azotul degajat din humus. Humusul acumulează azot pe calea fixării lui biologice din aer și pe calea descompunerii resturilor vegetale și animale. Acumulat lent, humusul este dagajat la fel de lent (după convertirea în nitrați) în soluția solului de unde este absorbit de rădăcinile plantelor. Folosirea uriașului aport al microorganismelor este posibilă prin asigurarea rotației culturilor, renunțarea la monocultura de cereale (fără micșorarea producției totale prin folosirea unor soiuri mai productive) și la scoaterea din cultură a unor suprafețe arabile, substituirea îngrășămintelor sintetice cu substanțe organice naturale (gunoi de grajd, resturi vegetale, ape uzate și resturi menajere tratate), crearea unor îngrășăminte chimice cu azot neinhibante pentru microflora din sol, capabile să elibereze treptat azotul și care să fie folosite în cea mai mare parte de către plante pentru prevenirea levigării, înlocuirea pesticidelor sintetice cu produși chimici nepoluanți și cu agenți biologici.

Un aport major în dezvoltarea unei agriculturi ecologice și micșorarea treptată a dependenței agriculturii față de industria chimică a îngrășămintelor cu azot, fungicidelor și insecticidelor îl va aduce genetica prin crearea unor genotipuri cu capacități biosintetice mai sporite care să utilizeze elementele nutritive din sol mult mai eficient și care să asigure depășirea actualului prag biologic de producție.

O agricultură științifică, înalt productivă, presupune asigurarea optimă a plantelor cultivate, în întreaga perioadă de vegetație, cu umiditate, elemente nutritive în cantitățile și proporțiile corespunzătoare succesiunii proceselor metabolice, un sol structurat, favorabil formării unui sistem radicular normal și caracteristic, apărarea de boli, dăunători și buruieni. În asemenea condiții de mediu, soiurile și hibrizii cultivați au asigurată posibilitatea exprimării tuturor potențialităților ereditare, astfel că nivelul dezvoltării organelor și funcțiilor, cu alte cuvinte fenotipul plantelor, va reflecta în cea mai mare măsură genotipul acestora. Multe din cheltuieli și din efectele dăunătoare asupra mediului pot fi micșorate, fără diminuarea producției, prin asigurarea unei succesiuni științifice a culturilor în timp și spațiu.

Realizarea unor asolamente raționale pe întreaga suprafață arabilă, cu revenirea aceleiași specii pe aceeași suprafață numai după o anumită perioadă, științific stabilită, va crea condiții echilibrate de viață pentru diversele specii cultivate asigurîndu-le elementele nutritive necesare în mod diferențiat potrivit cerințelor lor ereditare. Cum s-a mai arătat, porumbul, grîul și, în general, cerealele, absorb din sol cantități mari de azot, sfecla, cartoful, floarea-soarelui consumă mult potasiu, leguminoasele mult calciu etc. Diferă și cerințele față de apă. De exemplu, cele trei specii mari consumatoare de potasiu sînt și mari consumatoare de apă, în timp ce cerealele au cerințe moderate. Și rădăcinile exploatează straturi diferite: cartoful, floarea-soarelui și mazărea pînă la 0,60—0,90 m, grîul și sfecla de zahăr pînă la 1—1,25 m, porumbul pînă la 2 m, lucerna pînă la 6 m. Din cele relatate se poate deduce chiar succesiunea acestor specii: leguminoase → cereale → plante tehnice →. O asemenea succesiune este favorabilă atît plantelor cît și solului în care masa de rădăcini contribuie atît la structurarea cît și la îmbogățirea

în substanță organică (grîul lasă în sol la un hectar 2—2,5 t rădăcini + miriștea, trifoiul circa 4 t rădăcini etc.).

Rotația judicioasă a speciilor cultivate este un antidot redutabil împotriva agenților bolilor, dăunătorilor și buruienilor. Referitor la boli menționăm că în sol unele supraviețuiesc puțin, altele mai mult. De exemplu, făinarea și ruginile grîului (*Erisiphe graminis* și *Puccinia sp.*) nu rezistă în sol mai mult de un an, în timp ce mana florii-soarelui (*Plasmopara helianthi*) rezistă 6—7 ani, iar rîia neagră a cartofului (*Synchytrium endobioticum*) își păstrează viabilitatea 8—10 ani. Asolamentul, împreună cu lucrarea corectă a solului, împiedică cumularea și permanentizarea în sol a formelor de înmulțire a bolilor. O situație similară este și în privința dăunătorilor culturilor. De exemplu, nematodul sfeclei (*Heterodera schachtii*) rezistă în sol peste 4 ani (el dispare în lipsa sfeclei, rapiței, muștarului etc.), în timp ce gîndacul ghebos (*Zabrus tenebrioides*), rățișoara porumbului (*Tanymecus dilaticollis*) ș.a. se reduc sensibil numeric chiar și la o rotație simplă: grîu → mazăre → porumb, precum și la aplicarea la timp a lucrărilor solului. Plantele cultivate au în buruieni concurenți deosebit de activi în folosirea apei, elementelor nutritive, a spațiului și luminii. Se poate afirma chiar că buruienile sînt asociate în grupuri specializate care însoțesc cu precădere o anumită specie cultivată sau specii cu cicluri vitale similare. Specializarea a rezultat din adaptarea propriului ciclu de viață al buruienilor la ciclul de viață al speciei cultivate, ca și la tipul de lucrări caracteristice aplicat culturii date. Ca urmare, există buruieni caracteristice culturilor de grîu, altele pentru porumb, soia, sfecla de zahăr etc. Adaptarea buruienilor este puternic dăunată de rotație și favorizată de monocultură.

A fost demonstrat științific faptul că introducerea în asolament a leguminoaselor pentru boabe, dar mai ales a leguminoaselor perene este o măsură necesară cu urmări de importanță excepțională pentru fertilitatea și structura solului cît și pentru creșterea animalelor. Leguminoasele, trăind în simbioză cu bacteriile fixatoare de azot atmosferic, îmbogățesc solul pe gratis, cu acest element atît de necesar celorlalte specii de cultură, în special cerealelor, lipsite de această proprietate. După un sezon, mazărea, fasolea, soia etc., pe lîngă că lasă solul umed și curat de buruieni îl îmbo-

găteşte cu aproximativ 100 kg azot la hectar (sub formă de azot nitric şi amoniacal, precum şi fosfor uşor solubil), cantitate care corespunde cerinţelor unei culturi de grîu pentru a realiza între 2 300 şi 3 300 kg/ha (solurile intensive, de exemplu, Iulia, la Fundulea, pe un sol aprovizionat cu fosfor, la nivelul de 60 kg/ha P_2O_5, la doza de 100 kg/ha N a realizat producţia de 5 100 kg/ha). Lucerna şi trifoiul acumulează în sol aproximativ 150—250 kg/ha. În plus, aceste plante refac integral structura şi însuşirile fizice ale solului în special în amestec cu graminee perene, care contribuie la formarea unor agregate mari, hidrostabile şi îmbogătesc solul în calciu, magneziu ş.a. extrase din adîncime şi care se eliberează treptat odată cu descompunerea rădăcinilor.

A fost o vreme cînd s-a acreditat ideea că leguminoasele nu sînt plante rentabile economic. De aceea din timpul României antebelice (cu excepţia Transilvaniei) şi pînă azi suprafeţele cultivate cu leguminoase pentru boabe (mazăre, fasole, soia) sînt extrem de mici (din suprafaţa arabilă, în 1938, circa 1%, în 1960, circa 1,5%, în 1970, circa 2,3%, iar în 1979, 4%). Producţiile obţinute sînt de asemenea mici (la mazăre, în 1938 — 9,8 q/ha, în 1979 — 9,4 q/ha; la fasole, în 1938 — 3,3 q/ha, în 1979 — 6,1 q/ha; la soia, în 1938 — 9,4 q/ha, în 1979 — 12,7 q/ha; asemenea recolte mici la specii cu un potenţial de producţie cel puţin dublu şi care n-au nevoie de îngrăşăminte relevă, obişnuit, culturi îmburuienate).

Faţă de cerinţele în proteine ale populaţiei, de necesitatea refacerii structurii solurilor şi a cantităţilor de azot organic extras de plantele cultivate, nefixatoare de azot, se poate aprecia că suprafeţele mici ocupate de leguminoasele pentru boabe, cu toate eforturile desfăşurate pe alte planuri, au frînat creşterea producţiei agricole. Pe glob, leguminoasele pentru boabe ocupă anual o suprafaţă care reprezintă 10,5% din terenul arabil. Ponderea leguminoaselor pentru boabe apare ca o condiţie a trecerii la o agricultură prosperă, nepoluantă şi cu produse nepoluate. La suprafeţele cultivate cu mazăre, fasole, soia se adaugă suprafeţele cultivate cu lucernă şi trifoi (în 1938 — 307 600 ha, în 1979 — 549 600 ha). Astfel, culturile leguminoase (pentru boabe şi furaj) au ocupat în 1979, 9,5% din suprafaţa arabilă.

Pentru a beneficia de efectul ameliorator al solurilor determinat de plantele leguminoase, cît şi pentru sprijinirea zootehniei este necesar ca leguminoasele să revină pe aceeaşi suprafaţă în medie la 7—8 ani. Aceasta ar însemna sporirea suprafeţelor cultivate pînă la 1,5 milioane hectare (din care lucerna şi trifoiul, circa 1 milion hectare).

Producţia de cereale în care ponderea porumbului este hotărîtoare a bătut, practic, pasul pe loc între 1976—1979 cu toate că îngrăşămintele chimice administrate au sporit cu 23,3% (cele peste 3,25 mil. ha în medie suprafaţă cultivată anual cu porumb au reprezentat 51,3% din totalul suprafeţei cultivată cu cereale, o pondere din producţia totală de cereale de 57,7% şi o producţie medie la ha de 33,4 q; producţia medie la grîu + secară tot pe perioada 1976—1979 a fost de 26,3 q/ha). Situaţia este generată, cu precădere, de succesiunea grîu-porumb şi de suprafeţele mici cultivate cu leguminoase. În aceste soluri, neirigate sau irigate, au apărut condiţii improprii desfăşurării normale a proceselor metabolice în planta de porumb sau grîu: s-a distrus structura şi potenţialul productiv, s-a deteriorat complexul argilo-humic, s-a intensificat eroziunea, s-au acumulat substanţe toxice provenite din suprafertilizare, insectofungicide şi erbicide, boli şi dăunători. Se poate deduce că în asemenea condiţii, soiurile şi hibrizii oricît de valoroşi ar fi, iar cantitatea de îngrăşăminte chimice oricît s-ar spori nu va putea să determine revirimentul în producţia de porumb şi grîu.

Sporirea producţiei de porumb şi grîu presupune alcătuirea unui asolament de cîţiva ani din care să nu lipsească sola cu leguminoase (în prima fază leguminoase perene). Efectele favorabile ale rotaţiei şi ale includerii solei cu leguminoase pot fi îmbunătăţite printr-o agrotehnică corespunzătoare şi prin aplicarea îngrăşămintelor organice. Încorporarea periodică a gunoiului de grajd este măsura cea mai eficientă de menţinere şi sporire a conţinutului în humus al solului. Pe lîngă îmbunătăţirea însuşirilor fizice ale solului, cantitatea de 20 t/ha gunoi de grajd aduce aproximativ 100 kg azot, 20—30 kg fosfor asimilabil, 80—90 kg potasiu solubil şi o cantitate de microelemente în măsură să satisfacă cerinţele plantelor pentru o recoltă ridicată şi activitatea

microorganismelor din sol. Asocierea la gunoiul de grajd a îngrășămintelor minerale reprezintă o sinteză utilă care îmbină elemente ale agriculturii tradiționale cu elemente ale agriculturii industriale.

Folosirea îngrășămintelor chimice are rolul să completeze cantitățile de azot din sol produse de activitatea biologică, cantități care pot fi mai mici decît cele extrase de o cultură intensivă. De exemplu, pentru 100 kg boabe plantele de grîu extrag din sol 2,0—3,3 kg azot, 1,0—1,8 kg P_2O_5, 1,9—3,7 kg K_2O (în funcție de soi, climat etc.). Înseamnă că la o recoltă de 5 000/kg ha se extrag minimum 100 kg N, 50 kg P_2O_5, 95 kg K_2O. Soiurile valoroase pot utiliza mai puține îngrășăminte pentru aceleași producții. În regim neirigat soiurile cultivate în prezent la noi realizează o producție optimă cu un consum de 100—130 kg N/ha și 60—80 kg P_2O_5. Aceste cantități sînt de altfel și dozele economice (în irigat, consumul economic este mai mare cu 60—80 kg/ha). În stabilirea cantităților de îngrășăminte chimice care urmează a fi aplicate este necesar să se țină seama de rezerva de elemente nutritive din sol.

În fertilizarea organo-minerală se impune folosirea unor doze moderate, optime, de îngrășăminte chimice, aplicate corect și în momente științific stabilite, cînd absorbția lor de către plante este maximă, iar levigarea minimă. O asemenea utilizare a îngrășămintelor chimice poate contribui la exploatarea tuturor avantajelor pe care le oferă asolamentul cu leguminoase.

Fertilizarea trebuie să fie echilibrată în sensul unor proporții optime cu azot și fosfor. În cazul aplicării unilaterale a azotului, deci în lipsa fosforului (și a gunoiului de grajd), în plante se acumulează nitrați neasimilabili, iar în sol are loc o evoluție nefavorabilă a humusului și o dezechilibrare a activității microflorei. Evitarea măririi bruște a concentrației de azot ușor asimilabil pentru planta de cultură și microorganisme după administrarea îngrășămintelor cu azot — care sînt foate solubile — se impune sinteza unor noi tipuri de îngrășăminte cu azot greu solubile și netoxice (cum este ureea). Eliberarea treptată a azotului din îngrășăminte, sub acțiunea microorganismelor din sol, așa cum se întîmplă și în stare naturală, va asigura aprovizionarea

culturilor în funcție de cerințele lor fiziologice, va înlătura posibilitatea existenței în sol a unei concentrații toxice de nitrați pentru planta cultivată sau microorganisme și va micșora levigarea. Unele tipuri existente de îngrășăminte cu azot ca ureoformaldehidele, derivații crotonici, lignina amoniacală, corespund acestor cerințe. Folosirea acestui tip de îngrășăminte cu azot se impune neîntîrziat în legumicultură, deoarece legumele acumulează nitrați în cantități care pot fi nocive pentru consumatori. Aceeași problemă se pune și în cultura sfeclei furajere și altor plante furajere care pot acumula nitrați în concentrații toxice pentru animale. În această direcție sînt necesare încă intense cercetări.

Asocierea asolamentului cu o leguminoasă perenă în condiții de neirigare și irigare, cu doze rezonabile de îngrășăminte chimice cu azot și fosfor, este o măsură în stare să creeze unele condiții favorabile obținerii producțiilor medii prevăzute în perspectiva anului 1985 (cu un spor față de media anilor 1976-79 ce circa 14 q/ha la grîu și circa 20 q/ha la porumb, în condițiile reducerii suprafețelor la aceste specii cu 500 000 ha și creșterea corespunzătoare a suprafețelor cultivate cu lucernă și trifoi).

Dublarea suprafețelor cultivate cu lucernă și trifoi (în 1979 aceste specii au ocupat circa 560 000 ha) înseamnă cu mult mai mult decît dublarea producției de fîn (care va ajunge cu ușurință la peste 8 mil. t, determinînd condiții mult mai bune în special pentru creșterea taurinelor. Gunoiul de grajd rezultat, împreună cu resturile vegetale, cu deșeurile organice menajere și apele uzate, după o anumită prelucrare, vor contribui la asigurarea solurilor cu materia organică indispensabilă). Un milion de hectare cu leguminoase perene (1/10 din suprafața arabilă plus 500—600 mii ha cu leguminoase pentru boabe) alături de efectele favorabile asupra structurii solurilor și producției vegetale și animale, prin acțiunea bacteriilor fixatoare de azot vor îmbogăți solurile anual cu cel puțin 150 kg/ha azot organic. La 1 milion de hectare aceasta înseamnă 150 000 t azot s.a. sau 450 000 t azotat de amoniu, a cărui valoare ajunge la 500 mil. lei, care se obține cu totul gratuit, inclusiv o economie de aproximativ 192 mil. m^3 gaz metan și o cantitate uriașă de energie.

Rotația științifică, sola cu leguminoase, îngrășarea organo-minerală, agrotehnica aplicată corect etc. asigură controlul bolilor și insectelor și ridică gradul de control al buruienilor. Ca urmare, pe lîngă micșorarea folosirii pînă la un nivel scăzut toxic pentru mediu și om a nitraților și fosfaților, se poate reduce sensibil și cantitatea de pesticide folosite.

Supraviețuirea omului și a naturii, o viață cu lipsuri mai puține, nepîndită la tot pasul și din toate direcțiile de agresiunea unor factori fizici și chimici noi apăruți în mediu, iată ce poate aduce agricultura ecologică. Pentru aceasta trebuie depuse eforturi și realizate schimbări numeroase și pe diverse planuri: în concepția despre viitor și planificarea resurselor materiale, în organizare și cercetarea științifică, în stabilirea poziției, rolului, responsabilităților și viitorului omului în și față de natură. Se poate astfel prin acțiuni coroborate, emanate din legi naturale și legi sociale, să se declanșeze asemenea schimbări în sistemul producției agricole care să-l facă mai productiv și igienic și să-l aducă în armonie cu ecosistemul și cu interesele vitale ale omului.

REDUCEREA DEZECHILIBRULUI BIOCENOZELOR PRODUS DE PESTICIDE

Metodele chimice de combatere a bolilor, dăunătorilor și buruienilor (așa cum s-a precizat într-un alt paragraf) s-au dezvoltat și perfecționat, pe de o parte, datorită necesității apărării recoltelor strict specializate rămase fără apărătorii lor naturali, iar pe de altă parte, datorită adaptării inamicilor recoltelor la pesticide, care a dus la apariția dependenței agriculturii industriale de pesticidele sintetice (ca și față de îngrășămintele anorganice sintetice).

Sub influența pesticidelor au fost afectate, mai mult sau mai puțin, diversele comunități de organisme, plante și animale (biocenoze) care conviețuiesc în diverse biotopuri particulare, pe sol, în ape, în sol. Această situație a impus studierea pericolelor prezentate de pesticide și găsirea unor

metode netoxice sau relativ inofensive de protecție a culturilor. Cercetările au fost axate pe dezvoltarea și extinderea în combaterea diverșilor dăunători ai culturilor agricole, a unor agenți biologici sau metode biologice și a unor înlocuitori chimici selectivi.

„Lupta integrată" împotriva dăunătorilor

Bolile, dăunătorii animali și buruienile pot fi ținute sub control prin rotația culturilor, aplicarea corectă a lucrărilor solului și de întreținere a culturilor, prin folosirea unor soiuri și hibrizi rezistenți. În biocenozele nedezechilibrate de folosirea masivă și nerațională a pesticidelor sintetice, prin măsurile enunțate, populațiile de dăunători se mențin la un nivel la care ele nu produc pagube economice. Fac excepție biocenozele în care, prin mutație, au apărut rase fiziologice noi, mai virulente, față de care soiurile cultivate sînt susceptibile sau au fost aduse specii noi de dăunători din alte regiuni fără dușmanii lor naturali. În asemenea situații, ca și în cazul biocenozelor dezechilibrate, după cunoașterea prealabilă a componenților biocenozei date și a principalilor dăunători, pe lîngă rotație, agrotehnică și soi, este necesar să se intervină pentru aducerea la normal a echilibrului biocenozei, în scopul reducerii ponderii speciilor sau raselor dăunătoare. Reechilibrarea biocenozelor este posibilă prin includerea în acestea, pe cale artificială, pe baza unui plan științific, a unor prădători, paraziți, microorganisme entomopatogene și fitopatogene etc., în vederea distrugerii sau reducerii densității numerice sau atacului pînă la un nivel subdăunător economic. Aceasta este metoda sau lupta biologică. Cînd lupta biologică și celelalte mijloace de combatere nu pot ține sub control un anumit dăunător se intervine direct împotriva lui cu pesticide de sinteză (inofensive, netoxice sau slab toxice, selective și sistemice, înlocuirea prăfuirilor cu stropiri, folosirea unor produse granulate și microcapsulate, substituirea tratamentelor generale, la sol, cu tratamente la semințe, pe rînd, la cuib ș.a.).

Utilizarea combinată a tuturor mijloacelor și metodelor de combatere a dăunătorilor culturilor agricole este indicată

prin noțiunea de „luptă integrată" (în sensul utilizării tuturor posibilităților de combatere eficientă a unui anumit dăunător „țintă" și nu distrugerea integrală a biocenozei).

Lupta biologică. În biocenozele naturale numărul indivizilor diverselor specii este reglat de lupta pentru existență. În agrobiocenoze, componenta preponderentă este planta cultivată sau rasa de animale. Ele sînt creații ale selecției artificiale care a acționat în primul rînd în favoarea unor gene utile economic sau comercial (producție, calitate, agrement ș.a.) și mai puțin în favoarea genelor pentru adaptabilitate. Uneori, evident, nu în mod intenționat, cînd asemenea gene se moșteneau împreună cu altele nedorite (în caz că se găseau în apropiere în același cromozom, deci cînd erau linkage), selecția putea acționa și împotriva lor. Au fost eliminate astfel din speciile cultivate unele dintre genele care confereau rezistență la diverși factori dăunători biotici sau abiotici. Cerința pentru producții mai mari, pentru mecanizarea lucrărilor de întreținere, de recoltare, prelucrare și păstrare, dar și aspectul comercial și gustul consumatorilor etc., au impus formele uniforme în privința taliei, maturării, mărimii fructelor ș.a. Așa s-a ajuns ca genetica să pună la punct metode în stare să producă în masă sămînță și material săditor dintr-un singur genotip pentru suprafețe, uneori imense, nu numai pentru o zonă restrînsă sau provincie, ci pentru o țară, un continent, sau pentru toate zonele similare de cultură de pe glob (problema a fost prezentată într-un capitol anterior). Restrîngerea a diversificării genetice a plantelor cultivate, cu atît mai mult uniformitatea genetică a soiurilor și hibrizilor este o „invitație" deschisă pentru dăunători de a se specializa genetic și de a se înmulți exploziv. În aceste condiții, adeseori, chiar fără aplicarea pesticidelor neselective, concurenții naturali, prin parazitare sau prădare, nu sînt numeric suficienți pentru a distruge sau reduce dăunătorii.

Metoda luptei biologice a apărut tocmai datorită necesității echilibrării agrobiocenozelor prin folosirea serviciilor concurenților naturali ai dăunătorilor sau declanșarea la dăunători a unor procese fiziologice în scopul dereglării ciclului lor vital. Avantajele acestei metode de combatere este că omul, animalele și plantele din mediu nu sînt afectate în nici un

fel, că produsele alimentare sînt nepoluate și, în plus, că, în ansamblu, cheltuielile sînt mult mai mici comparativ cu metoda chimică de combatere.

În combaterea biologică a dăunătorilor animali se folosesc cîteva mijloace mai mult sau mai puțin extinse și eficiente: zoofagii, microorganismele entomopatogene, autocidia, hormonii endogeni și exogeni.

Dintre zoofagii prădători a fost amintită specia *Phytoseiulus persimilis*, care consumă ouă, larve, nimfe, ai păianjenilor tetranichizi acarieni foarte dăunători (de exemplu, *Tetranychus urticae)*, care atacă legumele și plantele ornamentale cultivate în sere, livezile și viile. Acarofagii, ca de altfel toți zoofagii, se înmulțesc în compartimente controlate, după tehnici adecvate, de unde la momentul oportun sînt lansați în densități numerice potrivite, în spațiul ocupat de dăunătorul țintă.

Afidele *(Myzodes persicae, Aphis fabae* etc.) sînt consumate de *Chrysopa vulgaris, C. carnea* etc. Gîndacul din Colorado, atît de răspîndit și dăunător culturilor de cartof, este prădat de ploșnița *Perillus bioculatus;* omida păroasă a stejarului *Lymantria dispar* este prădată de *Calosoma sycophanta* etc.

Printre paraziții mai cunoscuți sînt viespile afelinide dintre care *Aphelinus mali* parazitează păduchele lînos al mărului, *Eriosoma lanigerum*, iar *Encarsia formosa* parazitează musculița albă de seră, *Trialeurodes vaporariorum*. Viespea polifagă *Trichogramma evanescens* parazitează cîțiva dăunători primejdioși ai culturilor de cîmp: *Mamestra, Ostrinia, Sitotroga*, iar *T. embriophagum* parazitează diferite specii de lepidoptere *(Laspeyresia pomonella);* viespea parazită *Prospaltella perniciosi* distruge păduchele din San José, unul dintre cei mai importanți dăunători ai pomilor fructiferi, ai arborilor, arbuștilor ornamentali, a unor plante ierboase (căpșun), în total peste 200 de specii etc.

Insecticidele cu microorganisme. Asemenea tuturor organismelor și dăunătorii animali ai plantelor se pot îmbolnăvi de viroze, bacterioze, micoze ș.a. Dăunătorii animali pot fi atacați de peste o mie de microorganisme. De aceea, în vederea limitării numărului dăunătorilor, microorganismele entomopatogene se înmulțesc artificial, se include în „insecticide"

virotice, bacteriene şi fungice şi apoi sînt împrăştiate în mediu în focarele de dăunători ţintă, în vederea îmbolnăvirii concomitente, în masă, a dăunătorilor vizaţi (epizootie). Unele specii patogene atacă una sau doar cîteva specii dăunătoare, altele pot ataca mai multe specii de dăunători. Este eficient ca preparatele cu agenţi entomopatogeni să aibă un spectru de atac larg, pentru a îmbolnăvi cît mai multe specii de dăunători, şi să posede virulenţă ridicată dar strict limitată la specia sau speciile ţintă.

Dintre preparatele entomopatogene menţionăm cele care conţin bacterii sporogene (*Bacillus thuringiensis*), care se produc pe scară industrială (asemenea insecticidelor chimice). Preparatele cu *B. thuringiensis* au un spectru larg de combatere şi de aceea pe piaţa mondială a insecticidelor biologice cererile pentru acest produs sînt mari. Ele combat 137 specii de insecte din ordinele Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera şi Coleoptera. Bacteriile se dezvoltă în tubul digestiv al omizilor producînd septicemie şi apoi moartea în 2—4 zile de la tratament.

Diverse analize au relevat lipsa de patogenitate a preparatelor bacteriene faţă de entomofagii naturali ai speciilor de dăunători, ca şi faţă de entomofauna utilă (cu excepţia viermelui de mătase). Nu sînt patogene faţă de om şi vertebratele superioare. Pe piaţa insecticidelor, cereri ridicate sînt şi pentru preparatele din genurile de ciuperci *Beauveria bassiana* (care produce muscardinoza viermilor de mătase), pentru combaterea gîndacului din Colorado, a răţişoarei porumbului, şi *Metarrhizium anisopliae* pentru combaterea cărăbuşului cerealelor.

O importanţă aparte are *lupta autocidă*. În acest caz, radiaţiile ionizante şi multe substanţe chimice radiomimetice (care mimează efectele radiaţiilor) sînt folosite pentru inducerea în laborator (în magazii sau în silozuri) a sterilităţii la un anumit număr de indivizi din speciile dăunătoare, din ambele sau dintr-un singur sex. După sterilizare, indivizii sînt lansaţi în mediu în vederea copulării cu indivizi normali. Participarea la copulare a unor parteneri sterili determină depunerea unei ponte sterile. Eficacitatea metodei depinde de numărul indivizilor sterili lansaţi şi de capacitatea şi frecvenţa participării acestora la copulări cu indivizi normali (în concurenţă cu indivizi normali). Metoda a fost iniţiată şi aplicată cu mult succes în S.U.A. şi apoi în alte ţări, inclusiv în România.

Tratamentele cu *endohormoni* (hormonul juvenil sau neotenin secretat de *corpora allata* şi hormonul năpîrlirii sau ecdisona produs de glandele protoracale), care reglează creşterea şi ontogenia insectelor (năpîrliri, metamorfoză, maturare sexuală), tulbură ciclul insectelor dăunătoare ţintă, care nu mai sînt apte de reproducere. Pentru combatere, pe scară largă, se folosesc substanţe juvenoide analoage hormonului juvenil, extrase din diverse organisme sau produse sintetic. Substanţele juvenoide („regulatoare" de creştere) au fost utilizate pentru schimbarea ciclului vital şi în consecinţă reducerea numărului unor insecte: ploşniţa cerealelor, a păduchilor de frunză, a ţînţarilor, a omidei păroase a dudului ca şi la gîndacul din Colorado, musculiţa albă de seră, acarianul roşu comun etc.

Din grupa juvenoizilor fac parte şi insecticidele naturale denumite ***cromene***. Efectul acestora este de a bloca la numeroase insecte producerea hormonilor necesari propriilor metamorfoze, de la stadiul larvar la stadiul nimfal sau de la acesta la stadiul de adult. Descoperirea recentă a cromenelor (substanţe ca farinozina şi encelina) se datorează cercetătorului E. Rodriguez, de la Universitatea din Los Angeles, care le-a sesizat prezenţa în unele plante de deşert americane. Pînă acum se cunoşteau şi alte insecticide de origine vegetală, de exemplu, piretrinele, aflate în perii glandulari şi canalele secretorii, în timpul înfloririi, la o plantă africană *Chrysantemum (Pyrethrum) cinerariaefolium*, dar acestea acţionează prin contact asupra sistemului nervos, determinînd moartea prin paralizie.

Cromenele completează lista insecticidelor naturale, putînd înlocui cu succes insecticide chimice de sinteză, care sînt nebiodegradabile (cromenele sînt biodegradabile). Cromenele sînt toxice pentru unele specii de animale şi pot produce alergii la om, însă descoperitorul lor apreciază că aceste inconveniente pot fi eliminate din cromenele care vor fi produse sintetic. Firma chimică Ciba-Geigy este una din candidate pentru a produce noul insecticid.

Exohormonii sau *feromonii* controlează comportamentul insectelor (în găsirea hranei, a sexului opus, în cazuri de

primejdie etc.). Dintre aceștia, feromonii sexuali („atractanți" sau „momeli" sexuale), produși sintetic, sînt utilizați în diverse scopuri, mai ales pentru dezorientarea masculilor. Puși în „capcane" sexuale, feromonii care sînt specifici atrag masculii de pe o anumită distanță mai intens decît feromonii naturali ai femelelor, fapt care permite distrugerea lor prin contact cu unele suporturi cleioase. Distrugerea masculilor inhibă înmulțirea dăunătorilor. Într-o atmosferă încărcată cu feromoni sau antiferomoni (care inhibă acțiunea feromonilor produși de insecte) are loc o dezordonare a activității masculilor, înlăturînd posibilitatea copulării și deci a înmulțirii peste un anumit prag numeric a speciilor dăunătoare.

În lupta biologică împotriva dăunătorilor, orice mijloc este permis. Unul dintre acestea constă în inducerea trezirii în alt anotimp a insectelor. Tehnica pusă la punct de biochimiștii Universității de Stat din Ohio, S.U.A., urmărește modificarea ciclurilor substanțelor care fac ca insectele să adoarmă sau să se trezească în sezoane diferite. Forțarea insectelor dăunătoare să se trezească în plină iarnă va determina omorîrea de către ger, după cum forțarea altora s-adoarmă în sezonul cînd cresc plantele și se formează florile sau fructele preferate cu care se hrănesc, va duce, în final, la moartea acestora din cauza foamei.

În lupta integrată utilizarea insecticidelor sintetice apare uneori ca strict necesară: atunci cînd sîntem în fața unei înmulțiri explozive a unei specii, a unor invazii, a dăunătorilor din sol ș.a. În toate aceste cazuri, este necesar să fie folosite insecticide chimice selective pentru dăunătorul țintă, rapid degradabile, care să nu se acumuleze sub forma de reziduuri, cu o toxicitate cît mai redusă sau netoxice pentru restul viețuitoarelor din mediu, inclusiv pentru om. Se impune eliminarea din fabricație a insecticidelor cu spectru larg de acțiune, cu remanență mare, a căror reziduuri se acumulează în mediu și în produse. Acțiunea reziduurilor toxice asupra consumatorilor produselor agricole este partea cea mai gravă a pesticidelor care vizează întreaga omenire, la care se adaugă influența negativă a pesticidelor asupra echilibrului natural, apariția de rase de dăunători rezistente la insecticide, și înmulțirea în masă a unor dăunători, cunoscuți altă dată ca inofensivi.

Metoda combaterii chimice nepoluante a dăunătorilor va putea fi un ajutor adițional, eficace în reducerea pierderilor în lupta integrată, dacă se vor produce insecticide care să fie foarte eficace afectînd la dăunătorii nevertebrați ai agriculturii (nematode, moluște și artropode) alte sisteme fiziologice sau organe, decît cele prezente la vertebrate (păsări, mamifere și om), să nu fie nocive pentru fauna utilă, prădătorii și paraziții naturali ai dăunătorilor. Pot corespunde acestor cerințe majore pentru ocrotirea ecosistemelor insecticidele extrase din plante: pe bază de piretru și piretroide (naturale și de sinteză), nicotina (extrasă din *Nicotiana* sp.), anabasina (din *Anabasis aphylla*), veratrina (din *Veratrum album*) etc. și uleiurile emulsionabile de origine vegetală și animală. Piretrinele nu lasă reziduuri, au o remanență redusă, nu sînt fitotoxice și prezintă selectivitate pentru albine. Din cauza cantităților mici, în prezent, insecticidele biologice sînt foarte potrivite pentru combaterea dăunătorilor din sere, la legume în cîmp, leguminoase anuale și perene, sfeclă furajeră, în general, la plante a căror organe se consumă în stare proaspătă. Uleiurile horticole, produse din acizii grași extrași din uleiul de floarea-soarelui și arahide, de balenă și focă, ca și uleiurile din petrol și gudroane — din cărbune —, au o eficacitate insecticidă de contact ridicată prin pelicula formată la suprafața dăunătorilor sau ouălor acestora cauzînd asfixia.

Plante și recolte fără boli

Pentru prevenirea înmulțirii agenților patogeni, asolamentul bine alcătuit, împreună cu măsuri agrotehnice corect aplicate și folosirea unor semințe sănătoase, din soiuri rezistente sau tolerante la boli, sînt condiții determinante. Din aceste patru elemente ale unor culturi sănătoase, primele trei intră în atribuțiile planificării și ale celor care organizează și realizează producția agricolă. În funcție de coordonate și întreprinderi, orice rotație rațională ca și producerea și tratarea semințelor pot fi puse la punct după 2—3 ani, iar corectitudinea aplicării lucrărilor solului și de întreținere a culturilor poate fi asigurată anual și fenofazic. Aceste trei elemente, mai ales de natură organizatorică, sînt condiționate

de baza materială și influențate de pregătirea profesional-științifică și cointeresarea specialiștilor responsabili și a muncitorilor agricoli.

Al patrulea element, soiul rezistent, presupune o muncă de creație științifică, desfășurată de colective de cercetători, alcătuite din geneticieni, protecționiști, biochimiști, fiziologi. Primii au misiunea de a crea sau „inventa" prin metode genetice, inclusiv de manipulare a genelor, un material cu o mare diversitate și potențial ereditar, care să asigure identificarea unor genotipuri superioare genitorilor și soiurilor din cultură, în privința capacității de producție și a adaptabilității la condițiile mediului. Însușirile de adaptabilitate, deși distincte (comportarea la temperaturi extreme, la pH-ul solului, la utilizarea apei și a substanțelor fertilizante din sol, la dăunători animali, la boli etc.), este necesar să fie permanent urmărite pentru a le menține sau transfera în unul și același genotip. Deci, cînd se urmărește obținerea unui soi nou, superior în ansamblu soiurilor din cultură, pentru asigurarea unui nivel ridicat fenotipului, se includ în acesta acele gene, diseminate în diverși genitori, care-i va conferi caracteristicile ereditare urmărite. Pentru „asamblarea" într-un singur genotip a genelor cu efecte fenotipice vizibile, inclusiv rezistență la viruși, bacterii, fungi etc. adeseori sînt necesare hibridări succesive între genitori diverși, backcrossuri, autopolenizări, testări etc. Din relevarea acestor cîteva aspecte reiese că, obișnuit, munca de obținere a unui nou soi este de durată, continuă, implicînd un material inițial de ameliorare numeros, căruia i se adaugă mereu alte gene, prin eliminare întîmplătoare sau substituire controlată. Munca de creație biologică, inclusiv obținerea soiurilor rezistente la boli, pentru că implică obligatoriu, într-un fel sau altul, manipulări de gene, nu poate fi realizată de amatori, ci numai de geneticieni și amelioratori, posesori ai cunoștințelor științifice de ultimă oră, familiarizați cu tehnicile geneticii clasice și moleculare, care acționează în laboratoare de cercetare asigurate cu aparatură, instalații și condiții de lucru adecvate acestei activități de vîrf a științei.

Menționăm faptul că pentru obținerea prin metoda aneuploidiei (a substituirii cromozomilor) a unui soi multilinial de grîu (plantă autogamă; la alogame este mai complicat)

rezistent de exemplu, la 3 rase fiziologice de rugină brună care parazitează într-o zonă dată, sînt necesare trei etape, fiecare de aproximativ 5 ani (în fitotron 2—3 ani): prima — producerea la soiul de bază a celor 21 linii monosomice în vederea analizei genetice (stabilirea grupelor linkage — cromozomilor, în care sînt localizați locii cu alelele susceptibile la cele 3 rase); a doua — transferul cromozomului cu alela de rezistență de la donori în cele 3 linii monosomice stabilite, backrossarea, selecția citologică, testarea și autopolenizarea, în vederea obținerii celor 3 linii isogenice. Urmează apoi procesul de înmulțire a liniilor isogenice, stabilirea proporției de participare a liniilor, și lansarea în producție a soiului.

În laboratoarele specializate activitatea de creare a unor noi genotipuri este un proces care se desfășoară de zeci de ani, efectuat de echipe diverse care au acționat succesiv, în bună măsură, asupra aceleiași plasme germinative. Se obțin astfel genitori care acumulează chiar și parțial uriașul efort creator al cercetătorilor. Ca urmare, laboratoarele de genetică cu tradiție, receptive la noile cuceriri teoretice și tehnice, cu un colectiv de cercetători în care sînt îmbinate pregătirea cu experiența și îndrăzneala, au asigurate condițiile materiale pentru a obține soiuri din generații diverse de genitori, mereu mai perfecționate, tot așa cum laboratoarele de cibernetică în cele două-trei decenii de existență au ajuns succesiv pînă la calculatoare din generația a 4-a, a 5-a etc.

* * *

În lipsa elementelor enumerate de prevenire a înmulțirii bolilor, dar și datorită unor factori favorizanți, cum sînt umiditatea excesivă îmbinată cu căldura în sere, suprafertilizarea unilaterală cu azot, carența sau excesul unor microelemente, precum și în cazurile introducerii din alte zone a unor specii fitopatogene noi sau a apariției în urma mutației a unor rase fiziologice mai virulente, atacul bolilor poate să devină uneori deosebit de păgubitor. Asemenea situații au generat necesitatea combaterii bolilor.

Eliminarea plantelor sau a organelor vegetale bolnave urmată de arderea acestora (în special pentru distrugerea surselor de agenți ai bolilor virotice) rămîne mereu actuală.

Tratamentul termic a fost folosit şi pentru combatera unor boli transmisibile prin seminţe la (orz şi grîu; în prezent s-a extins tratamentul termic automat al seminţelor) şi pentru dezinfectarea solului.

Combaterea bolilor plantelor cultivate prin distrugerea acestora de către alte specii care le parazitează (proces similar zoofagiei parazite) poate deveni o metodă curentă, deoarece cercetările au relevat numeroase cazuri în care agenţii patogeni ai culturilor constituie hrană sau loc de înmulţire pentru alte microorganisme nepatogene pentru plante. Astfel, unii viruşi-bacteriofagii realizează ciclul lor vital în celulele unor specii bacteriene virulente pentru plante (*Xanthomonas* sp. care îmbolnăveşte prunul, fasolea, porumbul etc.; *Agrobacterium tumefaciens*, care atacă muşcatele, *Pseudomonas* sp. care atacă cînepa, tutunul etc.). Ciupercile patogene pentru plante pot fi parazitate de bacterii şi chiar de ciuperci (hiperparazitism). De exemplu, ciuperca *Darluca filum* parazitează sporii a peste 70 de specii care produc micoze la plante printre care *Puccinia* sp. De asemenea, speciile patogene din genurile *Puccinia*, *Cronartium*, *Ustilago*, *Podosphaera* etc. sînt parazitate de specii din genurile *Tuberculina*, *Trichotecium*, *Fusarium*, *Cicinnobolus* etc. Deocamdată, preparatele biologice de bactericide şi fungicide nu s-au extins. Ele au însă un potenţial ridicat de a reduce atacul unor bacterii şi ciuperci care parazitează plantele.

La fel de eficient în combaterea bolilor plantelor este folosirea antagonismului dintre microorganismele dintr-o biocenoză sau microbiocenoză, în special, din sol. S-a stabilit că în asociaţie, unele microorganisme pot interfera negativ (prin concurenţă, antibioză, parazitism) inhibînd sau distrugînd alte microorganisme, inclusiv unele patogene pentru plantele cultivate (de pe rădăcini, seminţe). În sol antagonismul este deosebit de acut, între microorganismele saprofite şi parazite, în detrimentul ultimelor, prin produsele metabolice eliberate de primele. Ca urmare, prin favorizarea înmulţirii saprofitelor din sol se poate reduce sensibil frecvenţa paraziţilor plantelor agricole. Unele bacterii pot fi antagonice ciupercilor patogene. De exemplu, *Bacillus subtilis* este antagonic speciilor de *Fusarium*. Antagonismul se poate manifesta şi între ciuperci, de exemplu, pe de o parte, între antagoniştii *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, iar pe de altă parte speciile fitopatogene *Fusarium*, *Ophiobolus*, *Rhizoctonia*, *Pythium* etc.

Antibioticele sînt utilizate atît în combaterea bacteriozelor, cît şi a unor micoze ale plantelor. Astfel, penicilina, teramicina (şi virocid) şi streptomicina (în doze de 100—200 ppm) pot fi utilizate curativ împotriva principalelor bacterioze ale plantelor cultivate (*Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia*, *Phytophtora* *Peronospora* sp., *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, ş.a.). Streptomicina, blasticidina-S, griseofulvina, hexamicina, trichotecina ş.a. au acţiune antifungică (dar unele şi antivirotică şi antibacteriană) putînd fi folosite împotriva făinărilor, ruginilor, pătării frunzelor, mălurii, fuzariozei, moniliozei, helmintosporiozei şi multe altele.

Răspîndirea în masă a unor specii patogene şi producerea unor pagube mari culturilor agricole a favorizat dezvoltarea metodei chimice de combatere a bolilor. Apărută în ultimele două-trei decenii, o dată cu dezvoltarea „industriei agricole", metoda de combatere a bolilor plantelor a urmat pe cea de combatere a dăunătorilor animali şi a buruienilor. A crescut numărul produşilor de sinteză şi cantităţile aplicate repetat, controlul bolilor devenind strict dependent de industria fitofarmaceutică. Din păcate, însă, noile preparate organomercurice (clorură de etil mercur, pentru tratarea mai ales a seminţelor), tiocarbamaţi (Dithane: pomi, viţă de vie, legume), tiurami (TMTD), nitroderivaţi ş.a., sînt deosebit de toxice.

În scopul obţinerii unor produse agricole sănătoase şi depoluării mediului ambiant, pentru ţinerea sub control a bolilor se impune generalizarea unor măsuri culturale corect aplicate (rotaţie, tratarea seminţei, soiuri rezistente etc.), folosirea preventivă şi curativă a biopreparatelor antipatogene şi antagonice, limitat a antibioticelor inofensive pentru mediu şi om şi a unor produse chimice netoxice sau inofensive pentru mamifere şi om. În cazul chimioterapiei, odată cu eliminarea oricărui risc pentru mediu şi om, creşterea eficacităţii este posibilă şi prin sintetizarea unor produse selective-polivalente, sistemice, cu acţiune preventivă şi curativă de lungă durată.

Nu doar preventiv prin tratamente de suprafață, „cutanat", ci preventiv și curativ, sistemic, prin circulație interioară, „intravenos". S-a arătat că mana viței de vie este produsă de ciuperca *Plasmopara viticola*. Boala a început de un secol să parazitezé vița de vie europeană și, practic, inițial, a adus-o în pragul distrugerii, dăunînd-o în proporție de 70—80% (mana a fost adusă din America. Primele infecții au fost observate în 1878, în Franța. În România, atacul de mană a fost semnalat, în 1887, probabil a apărut mai devreme, prin 1881, fără a fi detectat). Boala atacă toate părțile aeriene ale plantei, inclusiv florile, ciorchinii și boabele. În absența combaterii, mana reduce sensibil producția anului în curs și a anului următor (prin distrugerea coardelor). Potrivit metodei clasice de combatere împotriva manei, în anii normali, se aplică preventiv 3 — 4 tratamente cu zeamă bordoleză preparată încă din anul 1882 (în concentrație de 0,5; 0,75 și 1%).

Mana are o capacitate extraordinară de înmulțire, ea putînd să reinfecteze aceeași plantă de 10 — 15 ori într-un sezon (dintr-un singur oospor — forma de iernare pe resturi de viță care poate rezista doi ani — la germinare, primăvara, rezultă 15 — 20 zoospori, din care pot rezulta peste o sută de mii de indivizi infectanți). Eradicarea manei prin strîngerea frunzelor, lăstarilor etc. din vii este imposibilă, de aceea se impune recurgerea la combaterea chimică, de contact (de suprafață) cu zeamă bordoleză sau alte produse cuprice (oxid de cupru, oxiclorură, acetat și carbonat de cupru). Tratamentele cuprice au avantajul că pe părțile verzi ale viței lasă depozite persistente care eliberează cupru solubil de fiecare dată cînd plouă. Această solubilizare lentă este deosebit de activă în protecția tardivă a frunzelor.

Determinată de reducerea în lume a producției de cupru și scumpirea acestuia, în urmă cu circa 35 de ani au fost inițiate cercetări pentru găsirea unor înlocuitori ai cuprului. Așa au fost realizați produși organici de sinteză: ditiocarbamați (zineb, maneb, mancozeb, metiram, zinc ș.a.) și ftalimide (captan, folpel, captafol), mai eficace decît cupricele, primele în protecția strugurilor, secundele în protecția frunzelor de toamnă. În plus, folpelul este eficace și împotriva oidiumului, boală produsă de *Botrytis cinerea*. Amestecurile

cuprice cu fungicidele de sinteză (organo-cuprice) s-au dovedit mult mai eficace în protecția viței de vie. Ca și zeama bordoleză noile produse sînt preventive, de contact, și formează o peliculă protectoare pe cuticulă. De aici și inconvenientele lor: necesitatea stropirilor înainte de contaminare, pelicula de fungicid trebuind să acopere toate suprafețele plantei pentru a nu permite penetrarea în țesuturi a ciupercii, repetarea stropirilor imediat după fiecare ploaie, sau după 8 — 10 zile, cît durează protecția.

Combaterea manei prin tratamente preventive de suprafață este dificilă, deoarece ele constituie doar o barieră chimică în fața sporilor și miceliului avînd ca rezultat inhibarea pătrunderii ciupercii. Dar, ciuperca are un metabolism foarte apropiat de al gazdei, numeroase reacții și enzime ale lor fiind comune. Ca urmare, după contaminare, ajungerea la ciupercă și distrugerea ei fără omorîrea gazdei, a reprezentat o greutate de netrecut.

Relativ-recent (noiembrie 1977), cercetătorii americani de la societatea Dupont de Nemours au descoperit o nouă substanță activă în combaterea manei — DPX 3217. Ea penetrează în țesuturile viței de vie, unde distruge miceliul chiar dacă el se găsește în perioada de incubare, în care ciuperca se dezvoltă intercelular în țesuturile verzi. Caracteristic produsului este eficacitatea sa, fiind curativ și după 3 — 4 zile de la contaminare și rezistă în țesuturi protejîndu-le față de o nouă infecție timp de 10 — 14 zile. Se reduce astfel numărul stropirilor (substanța nu mai este spălată de ploi, chiar dacă ele survin la o oră după tratament. DPX 3217 este aplicat și în amestec cu substanțe cuprice sau organice. Este foarte puțin toxic și fără nici un pericol pentru mediu.

Asemenea și altor fungicide sistemice (carboxin, benomyl) DPX 3217, după penetrarea în plantă, migrează o dată cu seva prin țesuturile conducătoare, xilem mai ales și floem, în toate țesuturile, inclusiv în cele tinere deosebit de vulnerabile, apărute după tratament, conferindu-le rezistență la contaminare.

Alte trei substanțe active penetrante și sistemice anunțate în 1978 — fosetyl Al, metalaxyl și milfuram — stau la baza unor produse sistemice și polivalente, sinergice cu

produse cuprice și organice (Mikal, rezultat din fosetyl Al + folpel, Rhodax — fosetyl Al + mancozeb etc.). Ultimele produse și cele pe bază de DPX 3217 au ajuns, în doi ani, să ocupe, în Franța, circa 40% din piața fungicidelor antimană[1]. Acestea sînt produse netoxice, nu lasă reziduuri și atacă doar miceliul ciupercii parazite pentru vița de vie manifestînd o foarte mare selectivitate (LD_{50} variază între 669 și 5 800 mg/kg; LD_{50} la cafeină este 150 mg/kg, iar la nicotină 55 mg/kg greutate vie/animal; o substanță este foarte toxică la LD_{50} sub 5 mg/kg, iar toxică la LD_{50} sub 50 mg/kg).

Cercetările viitoare urmează să descopere noi substanțe sistemice, polivalente, care să confere protecție pe o perioadă și mai lungă, eventual un singur tratament pentru un sezon de producție (la vița de vie un an) și la cît mai multe boli (fără a produce la speciile patogene fenomenul de rezistență, prin blocarea proceselor mutagene în paraziți).

În lupta împotriva patogenilor, alături de chimioterapie, bazată pe substanțe mai perfecționate în privința toxicității față de cîteva sau ansamblul de boli care atacă o specie cultivată, este necesar să se utilizeze și protecția biologică sau autoapărarea plantelor față de paraziții fitopatogeni. Această trăsătură se poate activa la plantele viguroase prin stimularea reacțiilor naturale de apărare, pentru a căpăta capacitatea de a intoxica organismul invadator. O asemenea capacitate se poate realiza de către plantă ca răspuns la contaminarea cu un microorganism patogen sau nepatogen, incompatibil, în zona de atac, prin secretarea unor substanțe noi (fitoalexine, asemenea anticorpilor animali, caracteristice fiecărei specii) cu efecte fungitoxice sau prin sporirea concentrației substanțelor de apărare (compuși fenolici) prezenți în plantă înaintea agresiunii.

Reacția unei plante la infecție și stimularea autoapărării este controlată genetic, se manifestă postinfecțional și contribuie la manifestarea rezistenței la boli a unor soiuri. Tratamentul cu unele substanțe fungicide, cum este fosetyl Al, stimulează reacțiile de apărare în planta gazdă. De exemplu, la tomate, în frunzele contaminate cu mană, *Phytophtora capsici* și tratate cu fosetyl Al s-au sintetizat substanțe

[1] Moinet Marie-Laure, *La mildiou de la vigne soigne par «intraveineuse»*, în „Science et Vie“, nr. 756, IX, Paris, 1980.

noi, terpenice și a sporit cantitatea de substanțe fenolice de 6 ori comparativ cu frunzele sănătoase și de 2 la 5 ori mai mult față de frunzele contaminate dar netratate. Fenomene similare de stimulare a autoapărării în prezența fosetylului Al au fost puse în evidență și la vița de vie. Observația făcută în urma analizei efectelor tratamentelor cu fosetyl Al la tomate, viță de vie și cartof, arată că acest produs s-a comportat de asemenea și ca un dopant ce stimulează capacitatea de autoapărare a plantelor. Aceasta a generat ideea asigurării imunității plantelor pe cale chimică ceea ce reprezintă o modalitate deosebit de eficace de inducere la plantele cultivate a rezistenței față de microorganismele patogene.

ESTE POSIBILĂ O AGRICULTURĂ PRODUCTIVĂ CU MAI PUȚINE ÎNGRĂȘĂMINTE CU AZOT?

Pe plan mondial, în 1979, s-au produs 62,3 mil. tone substanță activă îngrășăminte chimice cu azot (în 1978, la un hectar arabil s-au administrat în medie pe glob 28,7 kg s.a. îngrășăminte cu azot). Se estimează că în anul 2000 se va produce o cantitate de aproximativ 115 mil.t. s.a. îngrășăminte cu azot (cu toate că necesarul estimat este de cel puțin 150 mil. t. s.a. îngrășăminte cu azot, iar optimul 220 mil. t.). În România, în 1980, s-au administrat, aproape 800 000 t. N, 53 kg/hectarul agricol.

Fabricarea unor asemenea cantități uriașe de îngrășăminte cu azot, are la bază sinteza industrială a amoniacului din azot elementar și hidrogen (după procedeul Haber-Bosch):



$$N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3 + 21{,}9 \text{ Kcal.}$$

Azotul utilizat în această reacție, provine din aerul atmosferic, separat prin distilarea fracționată a aerului lichid sau prin consumarea oxigenului printr-o reacție de oxidare. Hidrogenul provine din prelucrarea, fie a hidrocarburilor obținute la gazeificarea combustibililor solizi (cărbune, cocs), fie a unor hidrocarburi lichide (benzine) sau gazoase (gaz

metan, gaze de rafinării). În 1972 numai în S.U.A., pentru fabricarea a 11,4 mil. t. amoniac anhidru s-a folosit o cantitate de 456 miliarde picioare cubice de gaz natural; 1 *cubic foot* — picior = 0,0283 m³). Procesul constă în oxidarea parțială catalitică și necatalitică a combustibililor gazoși sau lichizi, conversia CO cu vapori de apă în CO_2, separarea și purificarea H_2 și N_2 de (S) CO, CO_2, CH_4, comprimarea gazului de sinteză pur $3\ H_2 + N_2$ la 200—600 atm. și obținerea amoniacului NH_3 lichid la o temperatură de 400—650°C. Pentru producerea și prelucrarea fiecărui kilogram de îngrășămînt cu azot se utilizează 18 660 kilocalorii.

Prețul de cost/tona amoniac anhidru, în 1974, a fost de 279 dolari (prețul este influențat de costul hidrocarburii folosite, a energiei consumate și mărimea uzinei). În 1977, prețurile curente ale unei tone metrice de îngrășămînt chimic cu azot au fost de 200 dolari. Înseamnă că pentru îngrășămintele cu azot produse în 1979 (62,3 mil. tone; dacă folosim prețurile din 1977, dar care între timp au mai crescut) s-au cheltuit cel puțin 12,5 miliarde dolari. La aceste sume se adaugă cheltuielile legate de păstrarea, transportul și administrarea îngrășămintelor cu azot, care ridică prețul de consum cu aproximativ 50 procente.

Aceste uriașe cheltuieli pot fi drastic diminuate prin folosirea aportului microorganismelor fixatoare de azot atmosferic.

Biosinteza azotului atmosferic

Microorganismele din sol au o activitate prodigioasă. Cea mai complexă este activitatea bacteriilor care contribuie efectiv la transformarea substanțelor în forme asimilabile pentru plante. Procesul este condus de bacteriile amonificatoare, nitrificatoare, fosfobacterii, sulfobacterii și altele. La descompunerea materiilor organice și formarea humusului participă și ciupercile, iar actinomicetele iau parte la descompunerea treptată a humusului. Un număr restrîns de bacterii și alge din sol au capacitatea de a fixa azotul atmosferic.

Pe rădăcinile tuturor speciilor de plante leguminoase, precum și pe rădăcinile unor specii neleguminoase, trăiesc bacterii simbiotice care fixează azotul atmosferic. Dintre

neleguminoasele capabile să producă nodozități, în zona temperată au fost detectate specii din genurile *Alnus* (alun), *Ceanothus*, *Cercocarpus*, *Eleagnus*, din genul *Dryas*, o specie de *Comptoria*, iar în zonele calde, specii din genurile *Casuarina*, *Coriaria* etc., în total 322 de specii (indentificate pînă în anul 1968).

Bacteriile și algele albastre fixează anual, în medie, aproximativ 175 mil. tone metrice de N_2, din care în mediul acvatic 35 mil. t, iar în mediul terestru 140 mil. t, din care 90 mil. t. în terenul agricol, iar 40 mil. t. în păduri. La prețul amoniacului anhidru din 1974 (279 dolari/tona) cantitatea de azot fixată biologic în fiecare an ajunge la exorbitanta sumă de aproape 50 miliarde dolari.

Microorganismele denitrificatoare descompun nitrații din sol în nitriți, amoniac și azot elementar gazos care se reîntoarce în atmosferă (aproximativ 43 mil. t, azot din sol și 40 mil. t. azot din mări).

Trăsătura comună a microorganismelor fixatoare de azot este prezența în genotipul lor a genelor *Nif* („nitrogen fixation"), care în absența oxigenului controlează existența și acțiunea unei enzime: nitrogenaza. Grație energiei furnizate de planta gazdă sau mediul ambiant, nitrogenaza fixează azotul liber, N_2 și îl reduce în amoniac (NH_3). Amoniacul și produșii săi de transformare difuzează apoi în plantă și solul înconjurător. Fixarea biologică atinge un randament maxim de aproape 95% în nedozitățile leguminoaselor, grație bacteriilor fixatoare de azot din genul *Rhizobium*. Dar dacă leguminoasele pentru boabe fixează în medie pe an între 57 și 150 kg/ha, plantele cultivate neleguminoase nu fixează decît 5 kg/ha/an. De aici necesitatea fabricării și administrării plantelor neleguminoase a îngrășămintelor cu azot.

În urmă cu 15 ani a fost înregistrată o descoperire de importanță excepțională pentru zonele tropicale și subtropicale și anume simbioza dintre graminee și bacterii fixatoare de azot. Această simbioză se desfășoară normal la o temperatură optimă a solului de 31—40°C. O asemenea condiție este posibilă numai în zona tropicală, unde temperatura solului la adîncimea de 5 cm variază în cursul anului între 28,7—29,9°C, medii lunare și cu maxime de 37,9°C. Analiza proceselor simbiotice a relevat că acestea se desfășoară similar

acelora de la leguminoase inclusiv în privința capacității de fixare a azotului atmosferic. De pildă, simbioza gramineei *Digitaria decumbens*, cu bacteria fixatoare de azot *Spirillum lipoferrum*, realizează o cantitate de peste 90 kg/ha N fixat pe an.

Descoperirea a declanșat atît imaginația cît și cercetările. S-a formulat astfel părerea că prin manipulări genetice s-ar putea crea posibilitatea ca pe rădăcinile gramineelor cultivate să se dezvolte bacterii fixatoare de azot, cu o capacitate de fixare a azotului atmosferic tot așa de mare ca a bacteriei *Rhizobium japonicum* care trăiește simbiotic pe rădăcinile de soia. Prin transferul acțiunii bacteriilor fixatoare de azot doar la culturile cerealiere s-ar economisi, în lume, într-un an, 40 milioane tone de îngrășăminte cu azot, care în prețurile din 1977 costau 77 miliarde franci francezi.

În natură există două procese biologice, deosebit de perfecționate, prin care este captat azotul din aer: simbiotic și nesimbiotic.

Biosinteza simbiotică a azotului atmosferic. Pentru prezentarea procesului se folosește obișnuit simbioza dintre soia, *Glycine max* ($2n = 40$; $n = 20$ cromozomi) și bacteria producătoare de nodozități *Rhizobium japonicum* (o serie de cercetări afirmă că spre deosebire de unele bacterii a căror celule vegetative și endospori conțin „nuclei", genofori sau grupe linkage, haploide, speciile de *Rhizobium* care infectează trifoiul roșu, mazărea, soia etc., sînt poliploide). Această simbioză, care a fost bine cercetată, constituie un exemplu excelent pentru studiul fixării azotului (așa cum de altfel sînt și simbiozele realizate de trifoi și lucernă cu rizobii).

Soia ocupă pe Terra aproximativ 60 mil. ha, și există o tendință puternică de extindere a culturii. Astfel, pe glob față de deceniul VI, suprafața cultivată cu soia a crescut cu 50% în deceniul VII. Motivul? Valoarea deosebită a acestei plante: semințele soiurilor cu nodozități conțin în medie 37% substanțe proteice (soiurile ameliorate au însă un conținut și mai mare: 39,5—41,5%, pînă la 48% soiul Biloxi și 52% soiul Sioux). Substanțele proteice sînt de calitate excepțională (din ele se produce unt, lapte, lecitină etc. și pot înlocui carnea în alimentație). Semințele mai conțin 20,5—214% ulei, ocupînd primul loc în producția mondială de ulei.

Soia asigură o creștere a fertilității solurilor fiind, ca urmare, o foarte bună premergătoare pentru majoritatea plantelor de cultură.

La o recoltă de circa 2 700 kg/ha boabe se obțin aproximativ 1 000 kg proteine. Cifra arată necesitățile foarte mari ale soiei față de azot. Pentru recolta menționată soia consumă la hectar aproximativ 251 kg N, 59 kg P_2O_5 și 109 kg K_2O. Astfel, soia consumă cu 111 kg mai mult azot decît o recoltă de grîu de 5 000 kg/ha (cu 750 kg proteină la ha) și cu 81 kg N mai mult decît o recoltă de 7 000 kg/ha porumb (cu 700 kg proteină/ha) etc. La o recoltă de 5 000 kg/ha boabe o cultură de soia va consuma aproximativ 500 kg/N, 100 kg P_2O_5 și 210 K_2O. Pentru a compensa acest consum uriaș de azot, plantele de soia, ca și cele ale celorlalte leguminoase s-au adaptat genetic la conviețuirea simbiotică cu bacterii din genul *Rhizobium* capabile să fixeze azotul (N_2) din atmosferă. Din cantitatea totală de azot folosită de plantele de soia pentru întreaga recoltă, între 40—65% (și chiar 83%; la fasole pînă la 85%, la mazăre pînă la 78% etc.), se asigură prin intermediul bacteriilor, iar restul este extras din rezervele solului sau din îngrășămintele cu azot. Administrarea unor doze mari de îngrășăminte cu azot reduce contribuția azotului fixat biologic (de exemplu, doza de 168 kg/ha N a redus contribuția azotului fixat biologic la 2%). Temperatura scăzută și umiditatea solului redusă, pH-ul acid, insuficiența fosforului și a unor macro și microelemente sînt factori care reduc, de asemenea, activitatea rizobiilor.

Potrivit unor cercetări, prin bacterizarea și, respectiv, nebacterizarea semințelor înainte de semănat, fără fertilizare, producția realizată a fost de 3 962 kg/ha, respectiv 1 467 kg/ha. Cînd s-a aplicat azot în doze crescînde la hectar: N_{15}, N_{30}, N_{60}, N_{120}, producțiile la cultura bacterizată au rămas practic aceleași ca și la martorul nefertilizat: între 3 958 și 3 993 kg/ha, în timp ce la cultura nebacterizată îngrășămintele cu azot au determinat creșterea producțiilor la 2 637 kg/ha la doza de N_{15} și la 3 314 kg/ha la N_{120}. Îngrășămintele cu fosfor în doze de P_{40}, P_{80}, P_{160} și P_{320}, în cazul semințelor bacterizate au determinat producții între 4 026 și 4 207 kg/ha, iar în cazul semințelor nebacterizate (față de martor: 14,67 q/ha) producțiile au ajuns la 2 444 kg/ha și au crescut

pînă la 3 488 kg/ha (la P_{160}; la P_{320} producția a fost de 3 201 kg/ha). Aceste date demonstrează, pe de o parte, necesitatea bacterizării semințelor de soia înainte de semănat și efectele pozitive ale îngrășămintelor chimice în cazul semințelor nebacterizate, iar, pe de altă parte, neeficiența îngrășămintelor cu azot la culturile bacterizate și necesitatea aplicării fosforului la culturile bacterizate. Bacterizarea, plus fertilizarea moderată cu fosfor (32—50 kg P_2O_5/ha) și cu azot (N 33—65 kg/ha), în condiții de irigare sau de mediu nefavorabile (fracționat: 1/3 la semănat și 2/3 în timpul vegetației, eventual pe frunze) și aplicarea molibdenului sînt condiții necesare pentru realizarea unor producții maxime.

Genetica nodulării. Între descendențele combinației hibride Lincoln x Richland, cercetătorii Williams și Lynch (1954) au detectat alături de linii de soia normale care formează nodozități pe rădăcini și linii mutante rezistente la nodulare care nu formează nodozități. La hibridarea acestor linii, prima caracteristică se comportă dominant față de secunda, care este recesivă și segregă în generația a 2-a în raportul mendelian de 3 : 1. De unde simbolizarea: alela Rj_1 pentru nodulare, rj_1 pentru nonnodulare. Gena a fost intens utilizată în studiul nutriției cu azot și a contribuției nodozităților de *R. japonicum* la realizarea producției de boabe la soia. Folosind două linii izogenice, deosebite genetic doar prin aceea că una era homozigotă pentru alela Rj_1 ($Rj_1 Rj_1$), care asigura nodularea, iar a doua homozigotă pentru alela rj_1 ($rj_1 rj_1$) pentru nonnodulare, Weber (1966) a constatat că linia nodulată producea întotdeauna mai mult decît linia nonnodulată cînd se administra aceeași cantitate de îngrășămînt cu azot. Aceasta sugerează fie că N simbiotic este o sursă mult mai preferată decît N din îngrășămînt, fie că energia cerută pentru simbioză și reducerea N fixat este mai mică decît cea cerută pentru absorbția nitratului urmată apoi de reducerea acestuia de către linia nonnodulată.

Solurile noastre nu posedă sau posedă puține bacterii din specia *Rhizobium japonicum* caracteristică soiei. De aceea bacterizarea semințelor de soia înainte de semănat cu această bacterie fixatoare de azot specifică este determinantă pentru formarea nodozităților pe rădăcini. Producția este maximă cînd proporția plantelor cu nodozități ajunge la 97—100%, iar

numărul nodozităților pe rădăcinile unei plante la 25—40. Pentru aceasta pe o sămînță este necesar să ajungă între 200—1 000 bacterii (din preparatul numit Nitragin). Dacă se cultivă soia, după soia, iar cultura anterioară a fost bacterizată, operația nu mai este necesară. Cele mai multe și mai mari nodozități se formează în lipsa îngrășămintelor cu azot (în prezența fosforului), la pH neutru (optimum 6,5—7; bacteriile nu se comportă normal sub pH 5), în sol umed și la o umiditate atmosferică ridicată în timpul înfloritului și a formării semințelor, la o temperatură optimă de 20—25° C (chiar 27° C). Aceste condiții pot asigura fixarea a 78—100 kg azot atmosferic la un hectar cultivat cu soia. La fasole, soiul Delmar a fixat 121 kg/ha, N_2, care a acoperit 52% din cerințele plantelor (boabele au avut 41% proteine). Cînd acest soi (Delmar) a fost bacterizat cu rasa 110 de *R. japonicum* (caracteristic soiei), a fost fixată cea mai mare cantitate de azot: 160 kg/ha, ceea ce a reprezentat 59% din totalul azotului utilizat la o producție de 2 600 kg/ha, cu 41% proteine. Experiența relevă că speciile de *Rhizobium* nu manifestă o specificitate absolută, în anumite condiții ele pot forma nodozități și cu alte specii de leguminoase.

Formarea și structura nodozităților. Rădăcinile leguminoaselor prin exudatele produse stimulează în mod deosebit înmulțirea rizobiilor (rădăcinile cerealelor nu stimulează rizobiile). Pentru a produce o nodozitate sînt necesare cel puțin 10 bacterii. *R. japonicum*, ca și celelalte rizobii pentru alte specii leguminoase (*R. trifolii, R. phaseoli, R. meliloti, R. lupini, R. leguminosarum*), invadează soia prin perișorii rădăcinilor (fiecare reprezentînd o celulă) și, probabil, penetrează și celulele epidermale (în culturi de celule *in vitro* rizobiile pătrund în celulele periferale modificate ale calusului și nu prin perișorii rădăcinii).

După înmulțire, rizobiile se aglomerează aproape de vîrful perișorilor pe unde și pătrund în perișor, în care se multiplică în urma alungirii și septării, dinspre locul de pătrundere în celula-gazdă spre nucleul celular, care se află către baza perișorului. În perișor se formează astfel un singur fir de celule (a căror pereți celulari sînt sintetizați de celula-gazdă), asemenea unui filament hifal de infecție, cu lungimea

de 70—80µ. Creșterea firului de infecție se realizează într-un interval de 18—48 de ore. Apoi, firul de infecție pătrunde în celulele cortexului rădăcinii unde se ramifică în jurul nucleului, care (după ce rizobiile se eliberează din firul de infecție și devin libere în citoplasmă, cînd au formă tipică de bastonaș) crește și prepară celula-gazdă pentru diviziune. Într-o fază următoare, rizobiile se dispun spre periferia celulei gazdă unde se multiplică rapid, umplînd-o pînă la refuz (în acest moment, ele se adaptează vieții simbiotice, devin, în aparență, mai bacteroide sau mai lungi și vacuolate). În fiecare din celulele gazdă din nodozități se găsesc mai mult de 10 000 bacteroizi. Aceștia sînt plasați în multe pachete individuale, fiecare cu 3—4 bacteroizi, înveliți într-o membrană generată de celulele plantei. Masa bacteroizilor, înveliți în aceste membrane, reprezintă aproximativ 30% din greutatea totală a nodozității. Țesutul bacteroid este asigurat cu apă și hidrați de carbon de către plantă și cu bioxid de carbon atmosferic care servește ca substrat pentru reacțiile de carboxilare. Momentul este urmat de diviziunea rapidă a celulelor gazdă care determină formarea nodozității. Pe lîngă mitoză, diseminarea rizobiilor de la o celulă la alta se produce și prin migrare, prin plasmodesme. Cu cît rasa de rizobie este mai activă și cu cît substanțele de creștere aflate în țesutul invadat este mai mare, cu atît nodulii sînt mai mari.

Dezvoltarea nodozităților poate fi observată după 6 zile de la răsărirea plantelor.

Nodozitatea are patru zone distincte de diferențiere a țesutului: cortexul nodulului, zona sau regiunea meristematică de creștere activă prin mitoză, sistemul vascular și zona bacteroidă, în care se află sediul procesului simbiotic de fixare a azotului. Zona meristematică a nodulului este activă timp de 7 săptămîni, iar fixarea azotului poate fi detectată după 2—3 săptămîni de la formare și durează pînă la cîteva zile înainte de începerea putrezirii acestuia. Fixarea azotului durează pînă aproape de maturitatea plantei ca urmare a infecțiilor repetate cu rizobii și dezvoltării succesive a nodozităților.

În solurile în care s-au cultivat repetat, mulți ani, diverse specii de leguminoase, există și speciile de rhizobii caracteristice care pot trăi saprofitic. În plus, în cadrul fiecărei specii de *Rhizobium* există populații de rase-genotipuri. Acestea au apărut prin mutație și recombinare. Separarea acestora din nodozități este posibilă prin diverse tehnici (prin planta gazdă pe baza competiției și mai ales prin teste serologice). De exemplu, în S.U.A., *R. japonicum* a fost subdivizată în 8 rase care aparțin la 4 (sau 6) grupe serologice. (În statul Iowa, au fost detectate serogrupurile 123, 135, 31 și 3. Dintre acestea serogrupul 123 reprezenta 52% în toate solurile cu pH sub 8, iar serogrupul 135 era predominant în solurile cu pH între 8 și 8,5. Unele genotipuri de rizobie pot produce cloroza frunzelor superioare datorită sintezei unei toxine numită rizobitoxină).

Subdivizarea populației dintr-o specie de rizobie în genotipurile constitutive și relevarea capacității acestora de a forma nodozități, a caracteristicilor acestora și a eficienței fixării azotului permite folosirea în prepararea Nitraginului a celor mai valoroase rase sau serogrupuri, care sînt competitive față de tipurile aflate în sol și față de care alte bacterii sau actinomicete din sol producătoare de antibiotice (de exemplu, din genul *Streptomyces*) nu manifestă efecte antagoniste.

Genotipul plantei gazdă contribuie, stînjenește sau inhibă nodularea. Or, o producție maximă, potrivit potențialului ereditar al unui soi, este în funcție de complementarea genetică dintre gazdă și rizobie, de cantitățile de hidrați de carbon puse de celulele gazdă la dispoziția rizobiilor și a azotului organic pus de acestea la dispoziția gazdei. Deci, pentru a produce cel mai eficient nivel de nodulare un soi anumit pretinde doar anumite rase de *Rhizobium*. În fond, între producție și fixarea azotului este un raport direct. În cazul soiei cînd planta este de culoare verde-închis și, în aparență sănătoasă, iar nodozitățile au în interior o culoare roșie-trandafirie, se poate spune că nodularea este efectivă, iar fixarea eficientă.

Mecanismul fixării simbiotice a N_2. În nodozități trăiesc intracelular, celule rizobiale, numite bacteroizi (aceștia se deosebesc metabolic și biochimic de celulele rizobiale care trăiesc libere în sol). Declanșarea biosintezei N_2 este pusă în evidență de apariția în bacteroizi a enzimei care fixează N_2, nitrogenaza. Nici unul din simbionți nu produce singur

această enzimă. Probabil, informația genetică pentru nitrogenază se găsește parțial în genotipul plantei și parțial în genotipul bacteriei sau mARN pentru sinteza nitrogenazei (sau proteine gata sintetizate) sînt transferați din celula gazdă în bacteroizi unde are loc asamblarea sistemului nitrogenază. Oricum, nitrogenaza apare ca efect al unei completări între sistemele genetice ale celor doi parteneri: gazdă și bacterie.

Preparatele pure de nitrogenază din surse diferite pot fi separate în două componente distincte cu ajutorul cromatografiei anaerobe. Proteina din componenta I, mai mare, conține sulf, fier nonhemic și molibden, iar proteina din componenta II conține fier nonhemic și sulf. Prima proteină (proteina fier-molibden) are greutatea moleculară de 200 000—270 000, iar a doua proteină (proteina fier) 55 000—67 000. Ambele proteine sînt rapid inactivate de O_2 din aer. Componentele nitrogenazei din surse diferite sînt similare.

Culoarea roșietică din porțiunea centrală a nodozităților este dată de leghemoglobină în sinteza căreia sînt implicate gene bacteriale și ale plantei gazdă. Leghemoglobina care este prezentă în citoplasma celulelor (sau citosol) plantei din nodozități este asociată cu o funcție catalitică extraordinar de activă în fixarea azotului atmosferic molecular (este o metaloproteină colorată similară hemoglobinei prezentă în celulele roșii ale sîngelui avînd aceeași grupare prostetică — hemul — care este o feroporfirină — un pigment care conține fier — conjugat cu o proteină numită globină). Cercetările au relevat că hemul sintetizat de bacteroid trece în citoplasma celulei gazdă, unde este utilizat pentru sinteza leghemoglobinei (globina este sintetizată pe baza mARN, transcris pe gene din genotipul celulei gazdă).

Leghemoglobina și bacteroizii se găsesc împreună în cadrul membranei specializate înconjurătoare situată în interiorul celulelor plantei din nodozități. Leghemoglobina este sintetizată la începutul dezvoltării nodozităților, cînd are loc declanșarea fixării N_2. Cantitatea ei crește pînă la înflorit după care rămîne constantă pînă la senescență. În stadiul inițial al dezvoltării nodulilor, cantitatea de leghemoglobină crește foarte puternic depășind cantitatea de nitrogenază, apoi raportul dintre ele rămîne constant.

Ca și hemoglobina, leghemoglobina are o mare afinitate pentru O_2, cu care dă o combinație labilă și reversibilă, rolul ei fiind, probabil, de a facilita difuzia O_2 către bacteroizi pentru respirația acestora. Deoarece nitrogenaza este extrem de labilă față de O_2, leghemoglobina poate de asemenea controla producerea O_2 liber și poate preveni inactivarea nitrogenazei de O_2.

Fenomenul propriu-zis al fixării simbiotice a N_2, a infecției bacteriene, a nodulării, a sintezei nitrogenazei etc. a fost studiat într-o simbioză realizată *in vitro*: între calus de soia și *R. japonicum*. Fixarea N_2 și activitatea nitrogenazei a fost relevată cu ajutorul izotopului ^{15}N și a metodei reducerii acetilenei în etilenă (reducerea C_2H_2 pe gram de rădăcini uscate pe oră și producerea de C_2H_4). Izotopul ^{15}N a relevat fixarea N_2 de către nodozitățile de pe rădăcini și asimilarea azotului fixat. Metoda reducerii acetilenei fiind de 1 000 ori mai sensibilă decît metoda ^{15}N a evidențiat că nitrogenaza catalizează mai multe reacții, cum ar fi reducerea acetilenei în etilenă și reducerea N_2 în NH_3. S-a constatat că o plantulă de soia, în condiții favorabile de temperatură și umiditate, are nodozități vizibile la 9 zile după răsărire, iar fixarea N_2 începe la aproximativ 14 zile.

În stadiul inițial al dezvoltării nodozităților ele rețin aproape jumătate (30 la 50%) din totalul azotului fixat. În perioada următoare, a nodulării efective sau a fazei logaritmice, conținutul de N_2 fixat de plantele nodulate crește masiv, iar nodozitățile transferă plantei 80—90% din azotul fixat. În stadiul ultim, fixarea nu mai este logaritmică, iar azotul din organele vegetative este mobilizat și redistribuit organelor reproductive. Transferul azotului din nodozități atinge maximum în acest stadiu. Fenotipic aceste stadii ale fixării N_2 corespund stadiilor de producere a substanței uscate: preînflorire, înflorire și formarea păstăilor (cînd este fixat peste 80% din azot) și dezvoltarea semințelor, cînd, în cadrul fiecărui stadiu creșterea substanței uscate este logaritmică (și durează în total de la 30 la 85 zile după răsărire; cantitatea de N_2 fixată se dublează la fiecare 6—10 zile). Rata de fixare a azotului este mai mare în nodozitățile mari și mai redusă în cele mici, și descrește după înflorit.

Activitatea nodozităților are un ciclu diurn. Ciclul reflectă aprovizionarea cu produse ale fotosintezei. Astfel, pe plantele cultivate în condiții de zi lungă, care produc mai mulți hidrați de carbon, se dezvoltă mai multe nodozități și fixează mai mult azot față de plantele din același soi cultivate în condiții de zi scurtă. O scăzută sinteză a hidraților de carbon în frunze descrește nodularea și fixarea azotului. Condițiile de uscăciune din cîmp, probabil, inactivează nodozitățile. Lipsa prelungită a apei determină acumularea în nodozități a amoniacului care poate inhiba sinteza nitrogenazei (la bacteria *Klebsiella pneumoniae* pentru sinteza nitrogenazei este necesară plasarea în mediu *in vitro* a glutamin sintetazei active).

În procesul propriu-zis al fixării simbiotice a N_2, alături de nitrogenază participă N_2 molecular atmosferic (acceptorul de electroni), adenozin trifosfat-ATP (sursa de energie) și un reductant (sursa de electroni). Din nitrogenază ambele componente proteice sînt necesare în activitatea de fixare a N_2.

În timpul reacției nitrogenazei, energia de la ATP și electronii de la reductant cauzează o schimbare conformațională în proteina fier (din nitrogenază) convertind-o într-un reductant foarte puternic cu un potențial oxido-reducător de 400 milivolți. Această proteină fier complet redusă transferă electronii pe proteina fier-molibden, care la rîndul ei, reduce N_2. În timpul acestui proces 4 sau 5 molecule de ATP sînt hidrolizate pentru doi electroni transferați. Reducerea N_2 în doi moli de $2NH_3$ cere minimum 12—15 moli de ATP (în experiențe *in vitro). In vivo* per mol N_2 fixat se consumă 4—5 moli ATP la *Azotobacter chroococcum*, 20 moli ATP la *Clostridium pasteurianum* și între 21—25 moli ATP la *Klebsiella pneumoniae*; toate sînt bacterii libere). În lipsa ATP nu are loc fixarea N_2.

Pentru realizarea fixării N_2 și desfășurarea multiplelor procese metabolice bacteroizii au nevoie de cantități mari de energie din reducere și ATP. Energia este obținută din produsele fotosintezei plantei gazdă. Zahăr, glucoză și acizi organici sînt translocați în rădăcini și nodozități, apoi în bacteroizi, în care oxidarea acestora generează energia necesară (bacteroizii posedă enzime glicolitice și utilizează o varietate de acizi organici). Nitrogenaza este un acceptor de electroni cu energie înaltă, iar bacteroizii posedă un cărăuș, feredoxina, care, după reducere, transportă electronii la nitrogenază. Nucleotizii de nicotinamidă redusă pot funcționa ca reductanți ai nitrogenazei. Nicotinamid-adenindinucleotidfosfat redus (NADPH) generat de glucozo-6-fosfatdehidrogenază și cărăușul de electroni bacteroid-feredoxina și o flavoproteina (feredoxina) din *Azotobacter vinelandii* funcționează efectiv ca un sistem donor de electroni pentru nitrogenază. Ratele de reacție în aceste sisteme sînt relativ scăzute, iar reconstituirea cere adăugarea de NADPH-feredoxin reductază.

Nitrogenaza poate cataliza reducerea a numeroși compuși ca acetilena și N_2. Nodozitățile fixatoare de N_2 reduc N_2O în N_2, iar acetilena în etilenă, dar și cianida (CN^-) și azida (N_3^-).

Monoxidul de carbon (CO) și hidrogenul (H_2) sînt inhibitori competitivi ai fixării N_2. Ei interacționează cu N_2, dar nu sînt reduși de nitrogenază, care are o afinitate aproximativ de 30 de ori mai mare pentru CO decît pentru N_2. Respirația bacteroizilor nu este afectată de concentrațiile de CO, care produce însă inhibarea aproape completă a fixării N_2.

Nodozitățile eliberează H_2. Or, dacă N_2 și N_2O inhibă evoluția hidrogenului, înseamnă că nitrogenaza catalizează evoluția H_2. Cercetarea nitrogenazei parțial purificată a relevat că aceasta catalizează ATP- și reductant-dependent evoluția H_2. Acest ATP este diferit de ATP reversibil — independent evoluția H_2 catalizat de către hidrogenaze (care sînt prezente, de asemenea, în nodozități). Nodozitățile tinere degajă circa 16 moli de H_2 pe un mol de N_2 fixat la 0,25 atm. O_2. Odată cu creșterea aprovizionării cu O_2, crește și cantitatea de $H_2 \cdot N_2$ este un inhibitor competitiv pentru evoluția H_2. Cînd CO inhibă fixarea N_2, descreșterea în echivalenți a reductantului consumat pentru fixarea N_2 este similară cu echivalenții reductantului folosit pentru creșterea evoluției H_2. Chiar cu relevarea acestor relații rolul fiziologic al H_2 în timpul fixării N_2 este necunoscut. Este posibil ca H_2 să fie folosit de hidrogenază pentru reacția cu O_2 liber în vederea menținerii unui mediu anaerob pentru nitrogenază.

În nodozități are loc și reacția de schimb care produce

HD pentru deuterium, D_2, și donori și endogeni de H. Faptul că schimbul de H_2 este inhibat de CO și N_2O și este dependent de N_2 sugerează că nitrogenaza intermediază reducerea N_2 în NH_3, schimbînd un hidrogen cu D_2. Reacția de schimb cu nitrogenaza parțial purificată cere N_2, ATP și reductant. Aproximativ 2 la 3 moli de HD sînt formați pentru fiecare mol de N_2 fixat de către nodozități.

Eficiența maximă a fixării N_2 în nodozitățile de soia are loc numai la 0,1 atm N_2 și la 0,5 atm O_2 (peste această concentrație, O_2 inhibă fixarea). Fixarea N_2 de către nodozități este mai eficientă, în funcție de consumul de hidrați de carbon, la 0,3 atm O_2 decît la 0,1 atm. În soluri compacte și inundate fixarea N_2 de către nodozități este limitată probabil de lipsa O_2.

Amoniacul, primul produs al reacției nitrogenazei, este excretat de bacteroizi în citosol, unde este convertit în glutamină, asparagină și alți aminoacizi. Un interes deosebit îl prezintă din fiecare nodozitate un grup de celule înalt specializate dispuse în jurul elementelor xilemului rădăcinii, care funcționează asemenea unor glande secretoare în eliberarea asparaginei, glutaminei și a altor produse ale fixării în elementele xilemului, prin care sînt transportate în diferite părți ale plantei.

* * *

Plantele angiosperme terestre neleguminoase, care formează nodozități și fixează în simbioză azotul atmosferic, sînt comparabile cu plantele leguminoase. Astfel, *Alnus* sintetizează 40—325 kg/ha/an, *Coriaria*, 129—192 kg/ha, *Hippophae*, 2—179 kg/ha, *Ceanothus*, 60 kg/ha ș.a. Mecanismele fixării azotului atmosferic în aceste simbioze vor fi elucidate în viitor.

Algele albastre din genurile *Anabaena* și *Nostoc* stabilesc asociații simbiotice efective în fixarea N_2 cu diferite tipuri de organisme vegetale superioare. Astfel, porii de pe lobii frunzelor ferigii *Azolla* (folosită ca îngrășămînt verde în orezării) conțin *Anabaena* (fixează 60 kg N/ha/an), în nodulii rădăcinilor unor cicade tropicale se găsesc *Nostoc* și *Anabaena*, iar glandele de la baza frunzelor angiospermei *Gunnera* sînt invadate de *Nostoc* ș.a. Lichenii, asociații între fungi și alge albastre, fixează de asemenea N_2. Simbiozele algale fixează într-un an la hectar între 5 și 72 kg azot.

Biosinteza nesimbiotică a azotului atmosferic. Diverse microorganisme care nu trăiesc în asociere cu plante leguminoase, ci libere (*Azotobacter*, *Clostridium*, *Beijerinckia*, *Spirillum*, dar și bacteriile facultativ anaerobe *Enterobacter* și *Klebsiella*, precum și algele *Nostoc*, *Anabaena* ș.a.) utilizează energia solară depozitată în produse ale fotosintezei pentru a fixa biologic N_2 atmosferic în compuși care pot fi folosiți pentru sinteza proteinelor și altor produși. Aceste microorganisme includ bacterii din soluri și arbori în putrefacție, alge albastre care trăiesc libere în mediu terestru și marin, precum și asociațiile de alge albastre cu fungi, ferigi, mușchi și cu unele plante superioare.

Algele albastre și bacteriile fotosintetice, ca și leguminoasele, posedă mecanisme pentru captarea energiei solare. Există însă unele bacterii fixatoare de azot care trăiesc libere și care și-au pierdut capacitatea pentru fotosinteză. Acestea trebuie să obțină energia necesară din substanțe organice sintetizate de alte organisme. Tocmai disponibilitatea compușilor carbonici furnizori de energie limitează fixarea azotului de către bacteriile libere nefotosintetice. Astfel, în timp ce la bacteriile libere fixatoare nefotosintetice: *Azobacter sp.* și *Clostridium sp.* amplitudinea de variație a ratelor de fixare a azotului este doar de 0,1—0,5 kg/ha pe an, algele albastre fotosintetizatoare *Nostoc* și *Anabaena* care trăiesc obișnuit libere în orezării și pot asimila fotosintetic CO_2, devin independente față de o sursă externă de energie necesară în fixarea N_2. Într-un an/hectar aceste alge pot fixa între 2,4 și 44 kg azot.

Sisteme asociative fixatoare de azot. O serie de cercetări au relevat existența unor microorganisme fixatoare de azot pe rădăcinile unor graminee, inclusiv de porumb și grîu. S-a presupus că aceste sisteme asociative furnizează speciilor cultivate (și ierburi necultivate) nenodulate cantități însemnate de azot. Utilizarea metodei determinării variațiilor reducerii acetilenei a evidențiat diferențe în ratele reducerii acetilenei și fixării azotului în sistemele asociative. De exemplu, în terenurile tropicale situate la altitudini mai mari,

în unele sisteme asociative, au fost constatate rate ridicate de reducere a acetilenei. O cantitate de aproximativ 3 000 nonamoli de acetilenă redusă la un gram de rădăcini uscate pe oră s-a considerat că reprezintă o activitate de fixare a azotului corespunzătoare furnizării a circa 100 kg azot/ha într-o perioadă de vegetație de 100 zile, cantitate suficientă pentru o cultură de porumb. În zonele temperate, ratele reducerii acetilenei sînt mai mici.

Iată cîteva rate estimate privind reducerea acetilenei și fixarea azotului de către microorganisme asociate cu plante nenodulate la graminee tropicale, în terenuri din zone tropicale înalte: la *Paspalum notatum* a cărei rădăcini formează asociații cu *Azotobacter paspali* — 90 kg azot/ha/an, la porumb 2,4 kg N/ha/zi, iar în zone umede la orez 70 kg N/ha/an (maximum 52 kg N pe sezonul umed). Plantele din zone temperate cultivate în zone tropicale înalte realizează maximum 11 kg N/ha/an, un ecosistem de graminee (grîu și porumb) a produs 4,1 kg/N/ha/an. Cînd porumbul a fost inoculat cu *Spirillum* a fixat în seră maximum 734 g N/ha/zi, iar meiul *Pennisetum americanum*, maximum 42 kg N/ha pe sezon.

În toate cazurile prezența în sol a amoniacului reprezează sinteza nitrogenazei în bacteriile libere fixatoare de azot și inhibă nodularea la leguminoase. Concentrațiile mari de amoniac în mediu favorizează adăugarea unui grup adenil la glutamin sintetază fapt care determină represia sintezei nitrogenazei.

Obiective și perspective

Cercetările privind fixarea biologică a azotului, determinate, în special, de scumpirea surselor de energie și a materiei prime pentru îngrășămintele cu azot (gazul metan), precum și necesitatea reducerii poluării și a prețurilor produselor agricole, dar și de realizarea stabilității producțiilor vegetale, a stimulat ideea reconsiderării actualelor tehnologii aplicate în cultura plantelor. Și toate acestea într-o perioadă relativ scurtă. Datele obținute au demonstrat că este rațional să fie crescută dependența noastră de fixarea biologică a azotului.

Speranțele extinderii acestui proces natural au fost stimulate de rezultatele activității științifice realizate în unele țări cu o agricultură avansată. Orientarea cercetărilor este fundamentală și deosebit de complexă, dar ce progres uriaș va însemna pentru agricultură realizarea unor obiective majore cum sînt:

1 — dezvoltarea unor combinații de fixare a azotului între rase de *Rhizobium* foarte eficiente, competitive, insensibile la concentrațiile de amoniac și nitrați din sol și soiuri de leguminoase cu un potențial ereditar productiv ridicat;

2 — detectarea de asociații între rădăcinile gramineelor (grîu, porumb etc.) și bacterii fixatoare de azot cu capacitate mare biosintetizantă pentru regiunile temperate;

3 — transferul genelor fixatoare de azot de la bacterii direct în celulele plantelor superioare care să confere plantelor capacitatea ereditară de a folosi N_2 atmosferic;

4 — transferul genelor fixatoare de azot în bacterii inofensive capabile să invadeze celulele plantelor și să stabilească în acestea un sistem efectiv de fixare a azotului așa cum se realizează în nodozități;

5 — realizarea de hibrizi somatici (prin fuziunea unor protoplaști), în vederea creării unor noi asociații simbiotice între microorganisme și plante superioare etc.

CONSTRUIREA UNOR NOI PLANTE FIXATOARE DE AZOT

În paragraful anterior am prezentat cunoștințele actuale esențiale privind capacitatea unor microorganisme libere sau în simbioză cu unele plante superioare (leguminoase, arbori, arbuști) de a fixa azotul atmosferic.

Cîteva idei se desprind. Capacitatea de a fixa N_2 din aer este limitată la un grup mic de specii de bacterii și alge albastre. Unele trăiesc libere în sol: *Azotobacter vinelandii*, care fixează N_2 aerobic, *Klebsiella pneumoniae* care fixează N_2 în condiții anaerobe și altele. Unele bacterii fixează N_2 numai cînd sînt într-o asociație simbiotică cu o eucariotă.

Cel mai important gen de bacterii din această categorie este *Rhizobium* care fixează N_2 numai în interiorul nodozităților unor specii de leguminoase caracteristice cum sînt soia, mazărea, trifoiul, lucerna etc. Simbioza care asigură fixarea N_2 explică faptul că plantele leguminoase nu cer îngrășăminte chimice cu azot.

Cheia fixării biologice a azotului este enzima nitrogenaza, compusă din două molecule de proteină. Acestea, aparent, lucrează în tandem în crearea amoniacului din azotul gazos din aer și din hidrogenul conținut de materialul plantei numit feredoxină. Procesul trebuie combustiat de energia solară care este depozitată în plantă sub forma unei surse naturale biologice de energie — adenozintrifosfat (ATP). Pentru fiecare atom de N_2 fixat se consumă mai multe molecule de ATP. O trăsătură comună pentru toate sistemele fixatoare de N_2 este aceea că sinteza nitrogenazei este complet represată de prezența în exces a NH_4^+ (îngrășarea cu N inhibă formarea nodozităților). Ambele componente ale nitrogenazei sînt extrem de labile față de O_2 și de aceea trebuie protejate de aer. *Azotobacter, Klebsiella* și *Rhizobium* au evidențiat sisteme specializate care previn influențarea nitrogenazei de O_2. Una dintre cele mai importante descoperiri a fost aceea că nitrogenaza pe lîngă reducerea N_2 în NH_4^+, are de asemenea și capacitatea de a reduce acetilena în etilenă, gaz ușor măsurabil prin cromatografie. În acest fel, prin reducerea acetilenei, se poate investiga rapid cantitatea de N_2 fixată.

Toate procesele și etapele fixării N_2 sînt controlate genetic de genele *Nif* („nitrogen fixation"). Dintre acestea, unele sînt gene structurale care posedă informația pentru sinteza celor două proteine ale nitrogenazei, altele sînt gene reglatoare care participă la controlul procesului de fixare a N_2. Cîteva gene îndeplinesc roluri auxiliare în controlul sistemelor de enzime cum sînt acelea care furnizează energia necesară fixării azotului, în reducerea N_2 etc.

Relevarea genelor implicate în fixarea N_2 de către *Rhizobium* este deosebit de complicată, deoarece sistemele de enzime necesare pentru fixarea N_2 nu sînt sintetizate decît după ce sînt stabilite relațiile simbiotice în nodozitățile rădăcinilor unei gazde leguminoase compatibile. Oricum, genetica fixării N_2 de asociații *Rhizobium*-leguminoasă trebuie să includă genele care controlează capacitatea rizobiilor de a invada rădăcinile plantelor gazdă și genele care asigură relații simbiotice efective. La fel de complicată apare și genetica asociațiilor între bacterii și plante superioare. Din această cauză mecanismele genetice implicate au fost puțin studiate.

Cercetările moderne privind genetica fixării N_2 au fost inițiate de Streicher, Gurney și Valentine, în 1971, la Universitatea din California. Genele *Nif* au fost descoperite la *Klebsiella pneumoniae*, bacterie (strîns înrudită cu *Escherichia coli*) care trăiește liberă, fixează N_2 numai în condiții anaerobe și numai în cantitățile necesare pentru producerea proteinelor proprii, după care procesul se întrerupe. Acest grup de cercetători a utilizat bacteriofagul temperat P 1, folosit, obișnuit, pentru transducție la *E.coli*, în scopul analizei genetice a speciei *K. penumoniae*. La progresul cercetărilor a contribuit inducerea unor mutații în genele Nif (*Nif* sau *nif*$^+$ — alelă de tip sălbatic capabilă să fixeze N_2; *Nif*$^-$, *nif* sau *nif*$^-$ — alelă mutantă care nu fixează N_2). Apoi, cu ajutorul fagului P1 genele fixatoare de N_2 au putut fi transferate de la o rasă la alta de *Klebsiella*. Tot în 1971, Dixon și Postgate au realizat transferul genelor fixatoare de N_2 între rase de *Klebsiella*, prin conjugare, după introducerea în bacteria donor a unui factor de rezistență la droguri și obținerea unor plasmide care poartă regiunea cu genele *Nif*. Dar cele mai interesante experiențe ale acestui grup (1972) constau în transferul plasmidei care conține regiunea *Nif* și factorul rezistenței la droguri, în *E. coli* și în alte bacterii care nu au capacitatea fixării N_2. Genele *Nif* transferate în *E. coli* erau fie integrate în cromozom, fie localizate în ADN plasmidial. (Genele *nif* au fost transferate și în *Salmonella typhimurium* și *Azotobacter vinelandii*).

Experiențele de transducție și conjugare, ce implicau gene *Nif*, precum și transferul genelor *Nif* la *E. coli* (cu un cromozom circular perfect cunoscut în privința dispunerii genelor), au permis să se stabilească faptul că mutațiile *nif* sînt strîns linked (legate) de genele care specifică enzimele pentru biosinteza aminoacidului histidina.

Utilizarea și a altor tehnici (inducerea deficiențelor, transducția reciprocă ș.a.) a contribuit la stabilirea genelor marker din operonul histidinei *(his)*, creîndu-se condiții pentru alcă-

tuirea hărții acestei regiuni din cromozomul de *K. pneumo-niae*. A fost stabilită succesiunea genelor, numărul genelor, funcția genelor din acest sistem complex și frecvențele co-transducției dintre *his D* (histidin dehidrogenaza) și diver-sele gene *nif* convertite în distanțe de perechi de baze (kilo-baze — kb). Astfel, în regiunea cromozomală *his D — nif*, locusul *his D* ocupă poziția O, în poziția 6,5 unități de re-combinare este localizată gena *nif B* (pentru cofactorul mo-libden), în poziția 10 unități este localizată gena *nif F* (proteina pentru transportul electronilor), în poziția 30 este situată gena *nif D* (proteina MoFe pentru componenta I a nitrogenazei) și, alăturat, gena *nif H* (proteina Fe pentru componenta II a nitrogenazei). Regiunea *his-nif* este de 30 kb sau 20 megadaltoni lungime. După Kennedy și Dixon (1977), regiunea *nif* cuprinde doi operoni în care se găsesc 7 cistroni-gene: B, A, F, E, K, D, H). În general, cromo-zomul bacterial (ADN bacteroidului) care este dispus cir-cular, conține cel puțin 3 000 de gene. ADN din regiunea *nif* poate cuprinde circa 15 gene.

Cercetări similare au fost efectuate și la *Azotobacter vine-landii*. Și la această specie au fost induse mutații *nif* care cresc bine pe N fixat, dar care nu cresc pe baza N_2. Rezultatele obținute prin utilizarea în experiențe a acestor mutante a fost înțelegerea reglării sintezei nitrogenazei, a ordinii genelor *nif* în cromozom, poziția activă a nitrogenazei și existența unor factori, alții decît componenții nitrogenazei, care sînt ceruți specific de un organism pentru fixarea N_2. Unele dintre mutante, detectate serologic sau prin tehnicile specifice de colorare pe geluri poliacrilamidice, prezentau importanță agronomică deoarece ele continuau să fixeze N_2 chiar cînd era prezent N din îngrășămînt chimic.

Tipurile mutante de *K. pneumoniae* și *Azotobacter vine-landii* prezintă defecte în genele care codifică structura și reglarea nitrogenazei. S-a menționat că în toate organis-mele normale fixatoare de N_2 sinteza nitrogenazei este repre-sată de amoniac. Or, unele mutante induse și detectate de *Azotobacter* sintetizează nitrogenaza în prezența excesului de amoniac. O mutantă de *K. pneumoniae*, care conținea niveluri constitutive de glutamin sintetază, continua să sin-tetizeze nitrogenază în prezența excesului de amoniac.

Aceasta și alte evidențe au demonstrat rolul puternic regu-lator al glutamin-sintetazei în sinteza nitrogenazei.

Cercetările pot fi utile pentru agricultură prin de-tectarea unor specii și rase de microorganisme fixatoare de azot care pot forma asociații cu cereale, ierburi cultivate și alte plante neleguminoase. Astfel de asociații pot fi eviden-țiate prin studierea rizosferei acestor grupe de plante.

A fost menționat faptul că asociația simbiotică îngreuiază studiul genetic al rizobiilor. Nici *Rhizobium* și nici planta gazdă (leguminoasa) nu poate crește separat cu N_2. Din această cauză au fost căutate și izolate forme mutante care încetează procesul de formare a nodozităților în diferite stadii, ca și mutante care nu sintetizează una din componen-tele nitrogenazei. De exemplu, dintre formele obținute, în 1977, de Brill, la Universitatea Wisconsin, S.U.A., mutanta de *Rhizobium* SM 1 nu este capabilă să formeze nodozități pe rădăcinile de soia, în timp ce mutanta SM 4 produce noduli mici și verzi. Mutanta SM 5 formează nodozități care apar normale, iar în acestea este prezentă leghemoglobina; cînd însă bacteriile din aceste nodozități au fost examinate pentru activitățile nitrogenazei, a reieșit că era prezentă activitatea componentei I și absentă activitatea componentei II. Analizele serologice au stabilit că proteina II a nitroge-nazei era prezentă. Aceste rezultate au condus la formarea părerii că mutanta SM 5 este primul exemplu de mutație structurală într-o genă *nif* de *Rhizobium*. Alte mutante sînt mai active, comparativ cu tipul normal de *Rhizobium*. Astfel, în timp ce tipul normal reducea pe plantă/oră 149 nmoli C_2H_2 și avea 17 nodozități pe plantă, mutanta SM 31 reducea 324 nmoli C_2H_2 și avea 25 nodozități, iar mutanta SM 35 reducea 199 nmoli C_2H_2 și avea 43 nodozități. Asemenea mutante cu potențialități mai mult decît duble față de tipul nemutant au zestrea genetică necesară asigurării unor producții duble de N_2 fixat și implicit de dublarea pro-ducției de proteină. Aceste gene, cu o activitate foarte mare, pot face obiectul transferului în alte genotipuri de rizobii. Pentru producții mari (în acest caz de soia) este necesară relevarea locilor genetici în cromozomii plantei gazdă respon-sabili pentru fixarea N_2 în vederea detectării unor gene-alele cu potențial ridicat de fixare a N_2. Aceste gene-alele, cu acti-vități superioare tipului normal, pot fi transferate în noi

genotipuri de plantă gazdă (leguminoasă). Asocierea simbiotică a unor rizobii manipulate genetic cu plante, în care au fost incluse gene-alele mai active în simbioză și adaptabilitate, este modalitatea cea mai sigură de creștere a producțiilor la leguminoase.

Manipularea genelor care controlează fixarea N_2 în speciile de *Rhizobium* a fost inaugurată prin transferul genelor pentru activitatea nitrogenazei de la *R. trifolii* într-o formă de *K. aerogenes*, care a pierdut capacitatea fixării N_2. În aceste experiențe, transferul a fost realizat prin conjugare după introducerea unui factor F de tip R.

Cercetările au stabilit că la *Rhizobium*, genele *nif* sînt localizate într-o plasmidă.

Unul dintre cele mai importante obiective ale geneticii — transferul genelor *nif* din bacterii în porumb, grîu...

Cercetările moderne de genetică efectuate asupra unor microorganisme libere fixatoare de N_2, în special asupra *K. pneumoniae* și *A. vinelandii*, au evidențiat posibilitatea transferului genelor *nif* de la aceste bacterii direct în celulele plantelor neleguminoase cultivate: cereale, sfeclă, floarea-soarelui etc.

Acest transfer, realizat *in vitro*, va fi deosebit de dificil datorită complexității procesului fixării N_2. După cum am văzut numai regiunea *nif* din cromozomul bacteriei *K. pneumoniae* cuprinde cel puțin patru gene (pînă la 15 gene). La acestea însă se adaugă și altele care controlează diverse procese corelate din ciclul vital al bacteriei, inclusiv controlul protejării nitrogenazei de O_2 etc. Cînd genele *nif* de la *K. pneumoniae* sau de *R. trifolii* au fost transferate în bacterii recipiente de *E. coli*, respectiv de *K. aerogenes*, segmentul de gene de la donor a găsit în recipient totalitatea echipamentului genetic cromozomal și citoplasmic necesar funcționării corespunzătoare a genelor *nif* (așa cum s-a precizat *E. coli* normală, deși nu fixează N_2, este foarte strîns înrudită cu *K. pneumoniae*, iar în *K. aerogenes* recipient s-a produs doar substituirea segmentului cromozomal caracteristic care a pierdut funcția de fixare a N_2 cu gene *nif* de la *R. trifolii*.)

Spre deosebire de mecanismul prezent în celula bacteriană donor, celula plantelor superioare, potențial recipientă a genelor *nif* a evoluat divergent, structural și funcțional. O asemenea situație impune desfășurarea unor cercetări intense atît asupra bacteriilor donor de gene *nif* în vederea cunoașterii și mai complete a genelor implicate direct (genele *nif* sînt strîns grupate), dar mai ales a genelor implicate indirect în fixarea N_2, cît și a genotipului plantelor recipient în vederea decelării genelor care pot suplini funcția genelor bacteriene neimplicate în regiunea *nif*. Urmează apoi ca genele de la donor indirect implicate, dar strict necesare în fixarea N_2, să fie manipulate pentru aducerea lor în cromozomul bacterian alături de genele *nif* (de exemplu, a genei pentru sinteza glutamin-sintetazei, a genei care protejează nitrogenaza de O_2 ș.a.).

După aceste analize și manipulări genice pregătitoare realizate cu ajutorul unor endonucleaze de restricție urmează o altă etapă deosebit de dificilă: transferul regiunii *nif* de la bacterie în celula cerealelor etc. În vederea operației propriu-zise de transfer este necesar ca genele care fac obiectul transferului să fie incluse într-un vector sau vehicul, reprezentat de o moleculă de ADN, cu proprietatea de a fi acceptată de celula recipient (aparținînd plantei gazdă) și de a se replica independent în aceasta sau de a se fixa printr-un crossing over într-unul din cromozomi. Menționăm că Dixon și colaboratorii au reușit (în 1976) să construiască plasmide (RD 1, FN 68), care purtau regiunea *his-nif* de la *K. pneumoniae*. Unele plasmide pot purta numai genele *nif*. Se pun mari speranțe în folosirea plasmidelor Ti din bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (răspîndită în sol, care produce tumori la numeroase plante cultivate).

La bacterii vehiculii folosiți au fost factorii F (molecule mici din ADN dispuse circular), independenți-plasmidele sau integrați în cromozomul bacterian — episomii, precum și diverși bacteriofagi (viruși care parazitează bacteriile) cum este fagul P1. În experiențele de inginerie genetică la om în vederea transferului, de exemplu, a operonilor gal^+ și lac^+ de la *E. coli* într-o celulă umană *in vitro* a fost folosit bacteriofagul temperat λ (lambda). De asemenea este utilizat și virusul SV 40 (care produce tumori canceroase la unele

animale). La plante, alături de plasmide și diverși viruși temperați, pot fi utilizate ca vectori ai unor gene și organitele celulare, cloroplastele și mitocondriile, posesoare ale unor molecule de ADN. Includerea în celulele plantelor a ADN exogen, inclusiv a genelor *nif*, este posibilă prin folosirea *in vitro* a protoplaștilor și a unor celule embrionare (meristematice).

În celulele plantelor, genele *nif* se pot insera fie într-un cromozom, fie în molecula de ADN aflată în mitocondrii sau cloroplaste. Nu este lipsit de interes și studiul integrării în celulele plantelor recipient a întregului genom bacterial și chiar a unor celule bacteriene. S-ar imita astfel ceea ce natura a realizat în ere geologice trecute cînd celule eucariote au fost invadate de microorganisme procariote, care, prin evoluție, au dat naștere cloroplastelor și mitocondriilor.

După operația de transfer se va analiza *in vitro*, în culturi de celule și țesuturi, prin utilizarea unor tehnici adecvate inclusiv reducerea acetilenei, gradul de funcționare al genelor *nif* în noul genotip. Dacă în culturi de celule și țesuturi *in vitro* genele *nif* funcționează eficient se trece la embriogenizarea celulelor hibride în vederea regenerării unor plante întregi, care, la rîndul lor, vor fi testate în privința capacității de fixare a N_2.

Faptul că operonii *gal* $^+$și *lac*$^+$ de la bacteria *E. coli* au fost transferați cu succes *in vitro* în celule umane demonstrează existența posibilităților pentru transferul genelor fixatoare de N_2 de la bacterii și alge albastre la plante superioare și chiar în celule ale unor animale superioare. Economicitatea enormă a transferului genelor *nif* trebuie demonstrată de cercetările viitoare.

Realizarea între cereale, plante tehnice și rizobii a unor asociații simbiotice fixatoare de N_2, apare ca o operație mult mai dificilă decît transferul genelor *nif* de la *Klebsiella* și *Azotobacter* (bacterii libere fixatoare de N_2). Într-o asemenea încercare este necesar ca în plasma germinativă a grîului, porumbului, cartofului etc., să fie transferate de la leguminoasele cu simbiozele cele mai prodigioase (de exemplu, de la lucernă, trifoi) toate genele care sînt implicate în favorizarea și funcționarea eficientă a simbiozei cu specia de *Rhizobium* caracteristică (s-a precizat că fiecare leguminoasă

formează simbioză doar cu o anumită specie de *Rhizobium*), pentru realizarea unei compatibilități depline, funcționale între gazde și endofiți. Astfel, planta cerealieră sau tehnică recipient va trebui să posede atît gena sau genele care creează în rizosferă condiții favorabile pentru rizobii, cît și genele care permit invadarea rădăcinilor de către rizobii, multiplicarea acestora pînă la un număr eficient biosintetic într-o celulă (10 000 bacteroizi), nodularea independentă (două gene independente la mazăre), biosinteza nitrogenazei, leghemoglobinei, feredoxinei, translocării hidrocarbonatelor în bacteroizi etc., etc. Cînd genotipul recipientului, reprezentat de grîu, porumb, tomate ș.a., va poseda în urma manipulărilor genice totalitatea genelor necesare complementării genelor din genomul rizobiei implicate în simbioză și fixarea N_2, agricultura se va schimba radical.

După ce chiar și o singură celulă de la o plantă cerealieră va fi înzestrată cu capacitatea fixării N_2, geneticii i se va putea dedica odele cele mai inspirate și închina monumentele cele mai avîntate pentru nașterea speranței că omenirea va fi scutită treptat de povara unor cheltuieli enorme: 45 miliarde dolari anual, necesitate de fabricarea și manipularea îngrășămintelor cu azot (la necesitățile minime din 200—150 mil. t, dar la prețurile din 1977). De asemenea, se vor economisi cantități astronomice de gaz metan (circa 250 miliarde m^3), iar mediul ambiant și fiecare dintre oameni va fi eliberat de presiunea unor noxe care vizează însăși existența.

Numai gîndul că aceste obiective de importanță majoră pot fi atinse ar putea orienta societatea să asigure condiții optime pentru cercetarea geneticii fixării N_2 și manipularea genelor responsabile.

VII
AGRICULTURA NECONVENȚIONALĂ

Să înțelegem prin „neconvențional" realizarea de produse vegetale naturale în afara tehnologiilor clasice (sol → plantă → produs sau plantă → animal → produs). Neconvențional, în acest context, înseamnă „domesticirea" (luarea în folosință) a noii specii sau inventarea genetică a unor genotipuri inexistente de plante și animale, folosirea microbilor producători de glucide, lipide, protide, a fermentațiilor, a unor tehnologii speciale de prelucrare a biomasei, a culturilor de celule vegetale *in vitro* etc.

ORGANISME ȘI TEHNOLOGII NOI

În cărțile de cultură a plantelor sînt descrise pînă la 650 de specii agricole, horticole, furajere, ornamentale (din 250 000 specii cunoscute în flora Terrei.) Dintre speciile cultivate doar 40—50 ocupă suprafețe întinse și au rol esențial în alimentație. Astfel, meridianele și paralelele lumii sînt acoperite mai ales de grîu, orez, porumb, sorg, cartof, batat, sfeclă de zahăr, trestie de zahăr, fasole, mazăre, soia, arahide, floarea-soarelui, măslin, in, bumbac, tutun, cafea, cacao, tomate, vinete, ardei, ceapă, morcov, salată, vărzoase, castravete, pepene, măr, păr, viță de vie, piersic, banan, portocal, lămîi, lucernă, trifoi și încă vreo două trei duzini

de specii, care, împreună, realizează fondul principal de hrană pentru miliardele de locuitori ai pămîntului.

Cărțile de zootehnie descriu și mai puține genuri și specii de animale larg răspîndite. Vaca, bivolul, oaia, porcul, calul, cămila, capra, elefantul, lama, yakul, găina, curcanul, albina, viermele de mătase, iepurele de casă, și încă un număr de specii aproape egal degetelor de la mîini, grație homeostaziei pronunțate, însoțește omul de-a lungul și de-a latul pămîntului.

Aceleași cărți prezintă istoriile luării plantelor în cultură și domesticirii animalelor. Or, numărul acestor începuturi născute spre sfîrșitul paleoliticului superior (care a început în urmă cu circa 150 000 de ani și durează, în Orientul Mijlociu, pînă în urmă cu 15 000 de ani, cînd începe neoliticul) și dezvoltate în neolitic, cu mici excepții, au corespondență în actualitate. Omul primitiv, obligat să se fixeze de un loc, va fi încercat gustul, proprietățile hrănitoare și adaptabilitatea la cultură și la creștere la numeroase specii vegetale și animale. Observațiile și experiențele repetate l-au determinat însă să păstreze doar pe unele, cele mai potrivite a deveni anexă inseparabilă a vieții umane. Aceste specii vegetale și animale, cernute prin site dese de generații succesive împreună cu condițiile variabile aspre ale mediului abiotic și biotic, s-au tradiționalizat, devenind obiect de cultură și creștere. Și astfel, șirul generațiilor umane, pînă la noi, a primit aceste specii ca o moștenire de la străbuni. Așa se explică marea stabilitate a numărului speciilor folosite de om și împăcarea omului cu această stare de lucruri. Două aspecte s-au schimbat însă continuu îmbunătățindu-se: proprietățile productive ale speciilor utilizate și tehnologiile de cultură a plantelor și de creștere a animalelor.

Agricultura și zootehnia au evoluat, așadar, prin ameliorarea proprietăților productive și adaptive ale formelor cultivate sau crescute, și, în principal, prin perfecționarea tehnologiilor de cultură a plantelor și de creștere a animalelor.

Oare în flora și fauna spontană nu mai există specii utile? Privite prin prisma agriculturii și zootehniei tradiționale sau practicate în prezent, probabil puține specii ar putea concura pe cele folosite, ameliorate de milenii de cultură. Cu toate

acestea flora spontană mai poate oferi surprize. Astfel, o expediție științifică întreprinsă într-o regiune muntoasă din Mexic, Sierra de Manantlan, a descoperit o plantă perenă cu caracteristici ereditare deosebite. Este vorba de o specie de teosint (înrudită cu specia *Zea Euchlaena mexicana*), asemănătoare porumbului prin frunzele late și florile din panicule. Se presupune că teosintul este unul din principalii strămoși ai porumbului (care este originar din platoul mexican). Noua specie, numită *Zea diploperennis*, preferă solurile umede, crescînd și în albiile cursurilor mai mici de apă; de asemenea ea a fost întîlnită și la altitudini de peste 3 000 de metri, supraviețuind frigului ca și căderilor de zăpadă. Avînd ca și porumbul, $2n = 20$ de cromozomi, această specie se poate încrucișa cu porumbul obișnuit, rezultînd un hibrid cu o robustețe superioară, ce moștenește, în plus, perenitatea teosintului. Faptul că se înmulțește spontan ar asigura o permanentizare a culturii eliminînd lucrările anuale de arat și însămînțat. Aceste caracteristici fac să se vorbească de posibilitatea ca noul hibrid interspecific: porumb × teosint, să se impună în agricultura viitorului.

Dar din alte puncte de vedere ce utilizări pot fi date speciilor spontane? Unele specii spontane pot avea o utilitate de excepție, pe de-o parte, ca donori de gene speciilor cultivate, iar pe de alta, ca producători de biomasă pentru biotehnologii.

Despre transferul de gene de la specii sălbatice în genotipul formelor cultivate s-a vorbit. A fost relevat faptul că în genotipul grîului,cartofului, mărului, tomatelor, fasolei, florii-soarelui, orezului ș.a. au fost transferate diverse gene, mai ales de rezistență la boli și la alte condiții de mediu adverse. De altfel s-a menționat că hibridarea sexuată supraspecifică nu a răspuns nici pe departe uriașului efort depus. Speranța fuzionării genotipurilor unor specii, genuri, familii, ordine etc. este rezolvată magistral de hibridarea celulară (somatică) a protoplaștilor, după cum transferului de gene i se deschid perspective deosebit de favorabile prin inginerie genetică (prin clonarea genelor și vehicularea lor cu ajutorul plasmidelor).

FOAMEA DE PROTEINE: UNELE SOLUȚII

O dată cu carnea, pîinea, leguminoasele consumate, omul își satisface necesarul de proteine. Principalul aport este al cărnii și al plantelor leguminoase. Or, și creșterea animalelor în sistem industrial presupune ca o parte însemnată a rațiilor administrate să fie reprezentată de furaje proteice. Deci, agricultura alături de diverse tulpini de plante ierboase, felurit prelucrate, trebuie să furnizeze furaje bogate în proteine. Acestea sînt sintetizate de unele plante proteice printre care soia, floarea-soarelui, in, rapița colza. Ele sintetizează și depun în bob (din substanța uscată) între 20 — 50% proteine brute, între 20 — 53% grăsimi și între 8 — 19% extractive neazotate, iar turtele, după extragerea uleiului, conțin între 25 — 50% proteine brute, între 5 — 30% grăsimi și între 7 — 40% extractive neazotate.

Puține țări dezvoltate își satisfac necesarul de proteine din producție proprie. O asemenea țară este S.U.A., care în același timp este principalul producător și furnizor proteic al lumii. Exportatoare sînt și unele țări în curs de dezvoltare, în care culturile de subzistență alimentară: meiul, maniocul, sorgul, ingamul și altele au cedat locul unor culturi speculative cum sînt arahidele, soia, cafeaua, cacao, trestia de zahăr, cauciucul, bumbacul. De exemplu, în 1979, în Senegal, 52% din terenuri au fost ocupate de arahide. În Brazilia, suprafețele cu porumb și grîu, cu orez și fasole neagră au fost reduse pentru a face loc soiei care se vinde la un preț mai bun și nu necesită îngrășăminte cu azot etc.

Pentru creșterea animalelor: bovine, porcine, păsări, principalele țări europene importă însemnate cantități de proteine furajere din alte țări, devenind dependente de acestea, mai ales de S.U.A. De exemplu, Franța, a importat, în 1977, 80% din proteinele necesare creșterii animalelor (3 mil. t de soia, arahide, in, colza și floarea-soarelui, pentru care s-a achitat o factură de aproape 3 miliarde de franci).

Remedii: pe de o parte, să se crească mai multe animale potrivit tradițiilor, iar pe de alta să se extindă culturile proteice, cu folosirea unor soiuri mai productive, și mai proteice, cu o calitate a proteinelor îmbunătățită (și ridicarea producției de cereale, mai puțin proteice — porumbul are

9 — 10 % — dar care formează baza alimentației animalelor crescute intensiv). În special se consideră că o producție sporită de soia a cărei proteine (33 — 50 % din substanța uscată) sînt bogate în aminoacizi esențiali, cu deosebire în lizină, care poate ajunge la 7 — 10 % din conținutul total de proteină a bobului ar fi hotărîtoare (la porumbul normal lizina ajunge doar la 1,6 % din proteină). Prin asocierea porumbului (60 %) cu soia (40 %) se obține un furaj echilibrat în proteine și aminoacizi esențiali ca și energia necesară creșterii animalelor.

Putem mînca plante „toxice"?

Răspunsul este afirmativ dacă... lărgirea sortimentului de genotipuri și specii cultivate apare o necesitate economică vizînd mai ales introducerea în cultură a unor specii noi, proteice, care să determine în ultimă instanță creșterea producției de proteine. Foamea de proteine, ca fenomen recunoscut, este de dată recentă, dar ea a existat și pînă acum. Aceasta a făcut ca printre plantele de cultură să fie incluse din flora spontană și unele specii proteice, potențial utile, dar care din anumite motive, în special toxicitatea unui organ sau a unei substanțe, au rămas la periferia alimentației umane sau furajării animalelor.

Rapița colza „redivivus"

Rapița mare sau colza se cultivă mai de mult. Chiar din antichitate este semnalată în țările din Orientul Mijlociu. Prin cultură se urmărea obținerea de boabe al căror principal component, uleiul, era folosit cu precădere la iluminat. Evul Mediu, dar mai ales mașinismul, a determinat extinderea culturii rapiței în Europa, în Extremul Orient, în Canada. Uleiul de rapiță era utilizat pentru ungerea mașinilor, pentru iluminat, pentru industria săpunului.

În ultimele cîteva decenii s-au adăugat noi întrebuințări: în industria textilă, a pielăriei, a vopselelor și lacurilor, în poligrafie etc.

Dar în alimentație? Uleiul de colza are gust neplăcut, o culoare închisă și vîscozitate destul de mare. Cu toate acestea a fost consumat de oameni. Consumul uleiului de colza s-a extins după aplicarea rafinării pentru îndepărtarea gustului neplăcut și pentru a i se da o culoare galben-deschisă. Pînă cînd? Pînă prin anii '60. Atunci studiile asupra unor șobolani în a căror rație 50 % din calorii proveneau din ulei de colza a relevat că aceștia prezentau infiltrații grase ale inimii, acompaniate de leziuni cardiace și întîrzierea creșterii în greutate. Pentru aceste efecte a fost încriminat acidul erucic (nesaturat dar solid) care reprezenta 45 — 54 % din acizii grași ai uleiului obținut din soiurile europene de colza. Cercetările efectuate asupra unor oameni consumatori de ulei de colza a condus la părerea că acidul erucic, la om, are influențe nefaste asupra inimii. În plus micșorează apetitul, întîrzie creșterea, îmbolnăvește ficatul și glandele suprarenale. Datorită acestor efecte nocive prin 1971 uleiul de rapiță a fost supus oprobiului opiniei publice vest-europene.

Analiza efectelor turtelor (rămase după extracția uleiului) în furajarea animalelor a relevat că acestea imprimă un gust neplăcut laptelui, că provoacă tulburări de digestie și inhibă creșterea animalelor tinere. Cauzele? Același acid erucic, și în plus încă unul, acidul gadoleic, a cărui cantitate ajungea la 10,9 % din acizii grași. La aceștia se adăuga prezența în ulei a unor glicozizi cu sulf (glicozinolați), care prin hidroliză, sub acțiunea enzimei mirozinaza, determină formarea de produși toxici. Glicozinolații dau plantei și uleiului un miros înțepător, iritant, de muștar și au efecte antitiroidiene. Aceasta exclude turtele din furajarea reproducătorilor: tauri, vieri, berbeci și găini ouătoare.

Rapița colza de toamnă apărea însă pentru unele țări europene deosebit de valoroasă agronomic, atît prin simplitatea culturii și efectele pozitive în asolament (lasă terenul curat de buruieni și este o excelentă premergătoare pentru cerealele de toamnă și pentru cultura a doua, se însămînțează în ultima decadă a lunii august și se recoltează în ultima decadă a lunii iunie), cît și pentru producția de sămînță, obișnuit, circa 2 500 kg/ha, și mai ales pentru conținutul acesteia. Astfel, sămînța conține (din substanța uscată) între 37—50% grăsimi, între 19—24% proteine (care posedă în afara lizinei toți aminoacizii esențiali, inclusiv mai multă

metionină, fapt ce face ca valoarea ei biologică să reprezinte 95% din aceea a soiei și 17—19% extractive fără azot.

Pentru aceste particularități foarte valoroase de cultură și productive, rapița colza de toamnă trebuia „inventată" dacă nu ar fi existat. Existînd, ea a fost supusă unor cercetări ample despre care se poate afirma că au determinat o a doua naștere, sau altfel spus „învierea" acestei plante. Alături de îmbunătățirea randamentului, a rezistenței la iernare, la boli și la numeroșii dăunători (care, de altfel, se pot combate chimic), genetica a făcut din colza o plantă adaptată condițiilor de climă europene, dar mai ales i-a dat calități alimentare și furajere superioare.

Prin 1960, folosirea uleiului de colza din vechile soiuri în rația șobolanilor producea asupra inimii și creșterii efectele menționate. Uleiul soiurilor supuse ameliorării împotriva acidului erucic și cultivate prin 1973, cauzau aceleași leziuni asupra mușchilor cardiaci, dar, practic, nu mai provocau infiltrații grase, iar animalele de experiență creșteau normal. Continuarea ameliorării a determinat reducerea conținutului de acid erucic în unele genotipuri la 0,4% și chiar 0%, iar a acidului gadoleic pînă la 0,3%. În aceste genotipuri-soiuri, concomitent, conținutul uleiului în acizi grași nesaturați, linoleic și oleic, a fost ridicat de la 14,2 respectiv 14% la 21,6, respectiv 59,4% (floarea-soarelui conține 60,8% acid linoleic și 26,5% acid oleic).

Dezvoltarea unui soi de colza (plantă alogamă și autogamă) fără acid erucic (0%) poate fi exemplificată cu experiențele amelioratorului canadian Downey. Acesta a obținut o linie de colza de primăvară fără acid erucic, cu genotipul recesiv, digenic, $e_1e_1e_2e_2$. Această linie donor a fost încrucișată separat cu un grup de linii de colza de toamnă franceze foarte productive, dar cu conținut ridicat de acid erucic, între 45 — 50%, produs de alelele dominante $E_1E_1E_2E_2$. Hibrizii F_1 cu genotipul $E_1e_1E_2e_2$ erau intermediari, conținînd 25 — 30% acid erucic. Fiecare descendență hibridă a fost apoi backcrossată de 4 ori cu linii bogate în acid erucic, pentru eliminarea genelor de la donor (în proporție de 96,88%), dar cu menținerea structurii heterozigote pentru locii implicați în sinteza acidului erucic ($E_1e_1E_2e_2$) care aveau un procent mediu de acid erucic. După BC_4 descendențele hibride

au fost autofecundate pentru homozigotare și segregare potrivit legilor mendeliene. Din acestea, 15/16 dintre descendenți (cu genotipurile $E_1 \cdot E_2$: 9/16 și $E_1e_2e_2$ și $e_1e_1E_2$, fiecare cu cîte 3/16) care aveau acid erucic au fost eliminate, iar 1/16 cu genotipul $e_1e_1e_2e_2$, lipsită de acest acid, a fost selecționată pentru fondarea unor soiuri noi, linii pure[1]. Se urmărește și reducerea acidului linolenic, în prezent 9,1% care determină rîncezirea oxidativă. Turtele acestor soiuri au marele avantaj de a fi potrivite în hrana animalelor (cantitatea de acid gadoleic fiind redusă de la 10,9% în soiurile vechi, la 0,3%). Prin folosirea unui soi polonez, Bronowsky, au putut fi reduse genetic și substanțele glucozinolate. Aceste îmbunătățiri permit ca turtele de colza să fie incluse în rațiile animalelor, fără ca randamentul acestora să sufere.

Cercetările întreprinse de F.A.O. asupra unor consumatori exclusiv de ulei de colza din soiurile ameliorate, din Polonia, India, Japonia, și recent din Franța, nu au putut stabili vreo corelație semnificativă între consumarea uleiului de colza și o eventuală creștere a bolilor cardiovasculare. Aceasta este favorizată și de faptul că există o diferență fundamentală între om și șobolan în privința capacității de metabolizare a acizilor grași cu cifră carbonică ridicată (acidul erucic: C_{22}, acidul gadoleic: C_{20}, acidul linolenic și acidul oleic: C_{18}, acidul palmitic C_{16}); șobolanul nu degradează acidul erucic în timp ce omul îl asimilează foarte bine. Uleiul noilor soiuri de colza a ajuns să fie de cea mai bună calitate, indicat chiar în tromboză (apariția în vasele sanguine a unor cheaguri) și alte boli ale sîngelui (produse de formarea cheagurilor sau trombilor).

Primul efect: în Franța, în 1978, au fost însămînțate cu colza 312 000 ha (în 1980 — 500 000 ha). În 1978, în Europa au fost cultivate 1 376 000 hectare și s-a realizat o producție medie de 21,5 q/ha (în România numai 6 000 ha, dar producția medie a ajuns la 23,3 q/ha). Dacă raportăm la conținutul chimic al producției soiurilor ameliorate înseamnă că în România, la un hectar cultivat cu colza, s-au obținut în medie, între 862 — 1 165 kg ulei, 442 — 559 kg proteine

[1] Demarly Y., *Génétique et amélioration des plantes*, Edit. Masson, Paris, 1977.

şi 396 — 442 kg extractive neazotate. (În acelaşi an, 1978, soia, cu o producţie medie de 11,4 q/ha a realizat doar între 193 — 307 kg ulei, în medie de patru ori mai puţin decît colza, 307 — 570 kg proteine, practic egal cu colza, şi 34 kg de amidon, de peste 12 ori mai puţin decît colza. Comparativ cu colza, în 1978, floarea-soarelui, cu o producţie medie de 16,0 q/ha sămînţă, a sintetizat şi ea mai puţine substanţe de rezervă la hectar, doar între 688 — 848 kg ulei, 240 — 352 kg proteine şi 224 — 240 kg extractive neazotate).

Aceste date demonstrează capacitatea şi stabilitatea mare a producţiei, precum şi calitatea excepţională a noilor soiuri de colza, care datorită intervenţiei geneticii pot concura cu succes soia şi floarea-soarelui (al căror potenţiale ereditare nu trebuie însă judecate după producţiile medii, realizate în ţara noastră, în ultimul cincinal).

Proteine din leguminoase... otrăvitoare

Plantele din familia *Leguminosae*, fiind înzestrate cu capacitatea de a forma simbioze cu bacterii din genul *Rhizobium*, au proprietatea ca în nodozităţile formate pe rădăcini să fixeze azot molecular din aer, azot care se include în proteine. Pe lîngă îmbogăţirea solului în azot acest mecanism permite sinteza de către plante a unor cantităţi însemnate de proteine, foarte bogate în aminoacizi esenţiali (de exemplu, din proteina bobului de soia lizina reprezintă 7—10 %, leucina 9,6 %, histidina 5,5 %, fenilalanina 4,4 %, precum şi izoleucină, metionină, treonină, triptofan şi valină) şi semiesenţiali (arginină 6,9 %, acidul glutamic, cisteină, prolină, serină şi tirozină); alţi cinci sînt aminoacizi banali care pot fi uşor sintetizaţi plecînd de la alte substanţe prin transferul unui grup aminat (alanină, glicocol, asparagină, glutamină, acid aspartic).

Pentru aceasta F.A.O. şi mulţi planificatori avizaţi văd în extinderea şi intensificarea culturii leguminoaselor principala speranţă pentru soluţionarea problemei deficitului de proteine. Dar, multe dintre soiurile speciilor cultivate (mazăre, fasole, soia, arahide) sînt foarte sensibile la boli şi la condiţiile pedoclimatice (în 1979, în România, producţia medie de mazăre a fost doar de 9,4 q/ha, la fasole în cultură pură de 6,1 q/ha, iar la soia de 12,7 q/ha).

Alcaloizii toxici. Unele specii de leguminoase mai puţin pretenţioase dar cu potenţialităţi productive ridicate care sintetizează, de asemenea, cantităţi medii destul de mari de proteine, de exemplu, lupinul — între 33,4 şi 44,8 %, latirul — între 24—35 %, bobul — între 27 şi 33 % etc., sintetizează concomitent alcaloizi toxici sau alte substanţe cu efecte negative în alimentaţie sau furajare. Tocmai aceste substanţe inhibă extinderea culturii pentru boabe a acestor leguminoase (se obţin curent la lupinul alb între 15—30q/ha boabe, iar la bob între 25—35 q/ha).

În boabele formelor neameliorate ale diferitelor specii de lupin, cantitatea de alcaloizi variază între 1,5 % (lupin galben) pînă la 32 % (la lupin alb şi peren), în timp ce în masa verde cantitatea este mai mică de 3—7 ori. Din această cauză lupinul s-a cultivat în lume doar ca plantă de nutreţ (verde, fîn, păşune, siloz şi îngrăşămînt verde, partea aeriană şi rădăcinile pot produce 200 kg N/ha). Cu excepţia unor populaţii locale lipsite de alcaloizi şi de la care se foloseau boabele, cultivate în Orientul Mijlociu, restul formelor cultivate conţineau în bob alcaloizii lupinin, lupinidin, lupanină (chinolizidina), oxilupanina, ictrogen, care dau gust amar şi intoxică organismul animal producînd boala numită lupinoză.

Pentru comercializarea boabelor lupinului toxic, şi folosirea acestora ca furaj, prin anii '30, în Europa, în scopul dezalcaloidizării a început să se aplice o tehnică folosită în Orientul Mijlociu şi anume înmuierea boabelor timp de 24—36 ore, apoi fierberea timp de 1—2 ore în vase neacoperite, urmată de spălarea cu apă rece. Astfel, se realiza eliminarea celei mai mari părţi a substanţelor toxice. Metoda aceasta deosebit de greu de aplicat la cantităţi mai mari avea şi neajunsul reducerii conţinutului în proteine.

Aplicarea metodelor genetice de ameliorare a asigurat selecţia unor genotipuri numite „lupin dulce" lipsite de alcaloizi. Boabele acestor genotipuri fără alcaloizi (cu cel mult 0,0025 %) sau cu conţinut redus (pînă la 0,2 %), după prelucrare, se folosesc ca nutreţ concentrat pentru toate speciile de animale (inclusiv pentru peşti).

Heterozidele şi antitripsinele toxice. Inducerea variabilităţii genetice, în special a mutaţiilor genice, în locii responsabili pentru sinteza altor substanţe cu efecte negative detectate la fasolea albă, ar putea fi lipsite de unele zaharuri indigeste, rafinoza şi stachioza, care produc gaze intestinale (hidrogen, metan şi gaz carbonic). Mult mai importantă este însă inducerea unor mutaţii la bob, *Vicia faba*, care ar inhiba sinteza unor heterozide (zaharuri neasimilabile), ce pot avea efecte toxice asupra unor oameni lipsiţi de o enzimă specifică (glucozo-6-fosfat dehidrogenaza) din eritrocite. Heterozidele atacă globulele roşii provocînd o anemie hemolitică gravă, denumită favism (crize similare poate produce şi administrarea de sulfamide şi ingerarea unor derivaţi de anilină, la care DL_{100} = 0,30 g/kilocorp).

La soia, turtele conţin antitripsine, ca urmare după ingerarea acestora de către animale, în intestine este inhibată acţiunea enzimei tripsina de a hidroliza legăturile peptidice în special la nivelul grupărilor carboxilice ale aminoacizilor arginina şi lizina. Or, inhibarea transformării proteinelor în aminoacizi anulează rolul hrănitor al turtelor de soia (ca şi al boabelor unei alte leguminoase, bobuşorul). Pentru evitarea acestui mare neajuns turtele de soia sînt tratate pentru neutralizarea antitripsinelor şi transformarea turtelor în furaje valoroase pentru animale. Asemenea turte sînt exportate de S.U.A. şi Brazilia. Inducerea mutaţiei la locii care sintetizează antitripsine, dar şi unii alcaloizi, ar putea asigura detectarea unor genotipuri de soia a căror turte s-ar folosi fără nici o restricţie.

Efectele toxice ale unor acizi aminaţi neproteici. Un număr însemnat de specii de leguminoase au capacitatea de a sintetiza un număr mare de aminoacizi neproteici (circa 300), care nu se inseră în proteine (în care sînt incluşi 20 de aminoacizi numiţi proteici, α-aminoacizii).

Dintre aminoacizii neproteici, unii sînt comuni pentru toate speciile vegetale: ornitina, saccharopina, homoserina şi citrulina, care intervin în procesele metabolice de bază ale plantelor. Alţi aminoacizi neproteici sînt caracteristici doar pentru anumite grupe de specii de plante. Dintre aceştia unii care sînt asemănători cu cei 20 de aminoacizi proteici normal încorporaţi în proteine, după ingerarea de către om

sau animale, datorită unor erori de recunoaştere de către acidul ribonucleic de transfer (tARN sau sARN), pot să fie incluşi în proteinele sintetizate de celulele animale. Astfel, celulele animale se otrăvesc prin producerea unor proteine care nu mai pot îndeplini funcţiile normale.

Aminoacizii neproteici, periculoşi pentru om şi animale, sînt produşi de speciile de latir, *Lathyrus sativus* şi *L. adoratus*. Prima specie, importantă sursă alimentară în unele regiuni ale Indiei, în Spania şi Portugalia, datorită rezistenţei la temperaturi excesive, sintetizează aminoacidul α-amino-β-oxalilaminopropionic, care prin includere în proteine umane produce o boală a nervilor numită latirism, caracterizată printr-o paralizie ireversibilă a picioarelor şi chiar moartea. A doua specie conţine un derivat al β-aminopropionitrilului, care la mamifere şi păsări provoacă alterarea sintezei colagenului şi elastinei, malformaţii scheletice, slăbirea pereţilor vaselor sanguine.

Alte specii conţin hipoglicină A, aminoacizi cu seleniu, mimozină şi alţi acizi aminaţi care se transformă în otrăvuri puternice dintre care unele cauzează moartea la om şi diferite specii animale.

Trebuie admis faptul că aceşti aminoacizi neproteici sintetizaţi doar de anumite specii vegetale, ca şi alte substanţe toxice sintetizate de plante sînt o armă a acestora, dezvoltată evolutiv, împotriva unor paraziţi animali (şi vegetali) care în urma consumării, se pot intoxica în diverse grade fapt care reduce atacul, asigurînd supravieţuirea plantei gazdă. Înseamnă că la aceste specii mutantele care nu mai au capacitatea de a sintetiza diversele substanţe toxice pentru animale (şi probabil şi pentru unele boli produse de organisme vegetale parazite, viruşi, bacterii, ciuperci) să piardă imunitatea sau rezistenţa faţă de dăunători şi boli. Aşa se poate pierde rezistenţa şi faţă de alţi factori nocivi din mediu: temperaturi extreme, lipsa umidităţii ş.a. De aceea, în programul de dezvoltare la aceste specii a unor noi genotipuri, pretabile consumului de către oameni şi animale, este necesar să se aibă în vedere şi o asemenea eventualitate, pentru ca, în procesul ameliorării unor caracteristici alimentare, să fie prezervate minimum de gene necesar unei autoprotecţii eficiente a noilor genotipuri la factorii nocivi, biotici şi abiotici, din mediul de cultură.

Şi tutunul poate deveni aliment?

A reduce numărul fumătorilor prin propagandă antitabagică pare o luptă cu morile de vînt. Pînă cînd ştiinţa nu va inventa un produs sedativ cu toxicitate slabă sau neglijabilă care să uşureze, să reducă, tensiunile psihice ale unora dintre oameni, fumători sau potenţiali fumători, fumatul se va practica, şi probabil, se va extinde. Cauza? Nicotina (alcaloid ca şi morfina) exercită o acţiune dublă: la început ea excită sistemul nervos parasimpatic (încetineşte ritmul cardiac, produce constricţia vaselor coronare, accelerează mişcările tubului digestiv, micşorează pupila etc.), apoi sistemul antagonic, sistemul nervos simpatic (coordonează activitatea inimii, contracţia şi dilataţia vaselor din organele interne: viscere, sexuale, plămîn, uter, stomac etc.). Deci, iniţial, contractă inima şi celelalte organe, apoi le relaxează. Sub influenţa nicotinei, iniţial, psihicul se linişteşte, apoi se intensifică acuitatea cerebrală. Aceste efecte sînt în mod particular apreciate de anxioşi (indivizi suferinzi de nelinişte, teamă fără obiect, de insucces, pericol etc.). Liniştirea sistemului nervos survine după cîteva minute de la începerea fumatului şi durează circa 30 de minute după care efectul liniştitor dispare din creier (se concentrează în stomac)... Şi aşa devine necesară o nouă ţigară... drogul trebuie împrospătat. Astfel, sutele de substanţe nocive din fumul de tutun continuă să fie inhalate, dintre care numeroşi acizi (nicotinic, acetic, benzoic etc.) irită plămînii, iar alţii (acidul clorogenic din fenoli), împreună cu mineralele (sodiu, plumb, titan, zinc ş.a. mai ales stronţiul şi poloniul) sînt cancerigeni. O activitate cancerigenă efectivă, recunoscută, aşa cum este precizat în altă parte, au nitraţii din îngrăşăminte şi pesticidele ajunse în frunze şi din frunze, prin fum, la nivelul celulei umane...

Se va fuma în continuare? Este o opţiune personală! Dar, unei părţi din producţia celor circa 4 500 000 hectare cultivate în lume cu tutun i se va putea da o întrebuinţare mai umană. Cîteva date: seminţele de tutun conţin 37—45 % ulei, 23—38 % proteină brută, 2—4 % zahăr; frunzele conţin în substanţa uscată între 1—6 % azot, între 6—17 % substanţe albuminoide, între 0,25—0,58 % aminoacizi, între 2—30 % hidraţi de carbon, între 8,5—23,0 % substanţe minerale, între 0,3—4,9 % nicotină, între 12—16 % acizi organici etc. (Să menţionăm că nicotina, din soiurile bogate în acest alcaloid este extrasă şi folosită prin diluare drept insecticid deosebit de eficient; nepoluant).

Despre folosirea tutunului ca aliment se pot spune încă puţine. Dar faptul că în substanţa uscată, în funcţie de soi, climat, îngrăşăminte şi momentul recoltării, conţinutul în substanţe proteice variază între 8 şi 25 % apare ca o mare promisiune. Acest conţinut este superior cantitativ (şi calitativ) proteinelor din boabele de cereale şi se apropie de acela al unor leguminoase pentru boabe (năut 23 %, fasole 24 %, mazăre, linte, bob, între 27—29 %... soia 38,5 %). Dar producţia ridicată de frunze uscate în 1978, media pe glob 1 293 kg/ha, dar 2 713 kg/ha în Japonia, 2 579 kg/ha în Franţa, 2 380 kg/ha în S.U.A., 2 358 kg/ha în Canada, 2 091 kg/ha în Polonia, (în România, în 1977, 920 kg/ha), la care se pot adăuga şi tulpinile, fac din tutun un concurent competitiv al soiei (media pe glob la soia în 1978: 1 481 kg/ha; în Canada: 1 946 kg/ha, în S.U.A.: 1 924 kg/ha, în Japonia 1 337 kg/ha, în România: 1 140 kg/ha). Înseamnă că randamentele de proteină ale tutunului la hectar pot egala pe cele ale soiei.

Potrivit cercetărilor lui S.G. Wildman, de la Universitatea din Los Angeles, proteinele din tutun au valoarea nutritivă acelora din lapte. Astfel, tutunul se recomandă ca o foarte valoroasă plantă proteică. Ne putem întreba: cînd va începe ameliorarea genetică a tutunului ca sursă alimentară?

REVOLUŢIE ÎN ECONOMIA ACTUALĂ DE MATERII PRIME AGRICOLE

Porumbul, sfecla de zahăr, grîul, soia, topinamburul şi multe altele pot livra tot aşa de bine alte produse decît cele pe care le livrează. Se poate produce astfel o adevărată revoluţie în economia actuală de materii prime agricole. O asemenea schimbare radicală nu este o dorinţă subiectivă,

ci o necesitate a prezentului şi a perspectivei. Ea depinde, printre altele, de proporţia suprafeţelor destinate consumului, prelucrării sau exportului, de dezvoltarea unor industrii biochimice de transformare, de grija faţă de refacerea şi păstrarea fertilităţii solului, precum şi de dezvoltarea cercetărilor, de pregătirea şi asigurarea cercetătorilor (în genetică, biologie moleculară, bio-energie, microbiologie, biochimie...), la nivelul urmărit în matematică, fizică, chimie.

În asemenea condiţii, biomasa vegetală nu va mai fi utilizată doar după reţetele obişnuite ci va fi supusă unor biotransformări a căror produse vor putea substitui, de exemplu, pe cele ale industriei de sinteză bazată pe petrol.

Să ne referim, în primul rînd la porumb, cultivat anual în Romania, pe o suprafaţă de aproximativ 3 300 000 ha, la care producţiile medii, pînă în 1985, pot ajunge în condiţii adecvate la 5 000 kg/ha boabe (plus 5 000 kg/ha tulpini şi 500 kg ha coceni). Din boabe industria furajelor poate obţine uree (pentru taurine) şi turte (pentru porcine), industria alimentară poate realiza biscuiţi, griş, bere, floricele, fulgi, porumb dulce glasat, conservat etc., industria de separare poate produce lipide-ulei, proteine şi acizi aminaţi (pentru animale), hidraţi de carbon-amidon, din care industria chimică poate obţine dextrină pentru alimentaţia umană, pentru papetării şi textile, ca şi lianţi industriali. Tot din amidon prin hidroliză enzimatică se poate fabrica glucoză, iar prin izomerizare enzimatică — fructoză. Reducerea chimică poate asigura obţinerea unor medicamente — manitol, sorbitol, iar fermentarea asigură producerea de acid citric, antibiotice şi... carburanţi lichizi şi alcooli. Tulpinile pot fi transformate în furaj şi îngrăşămînt, iar prin hidroliză, împreună cu cocenii în alcool şi furfural (solvent şi bază pentru sinteză chimică) etc.

Amidoneriile-glucozeriile vor putea produce cu succes zahăr şi din grîu, cartof, care îndulceşte practic la fel, dar care este mai puţin bogat în calorii decît zahărul din sfeclă. Dar sfecla de zahăr, ca şi topinamburul, grîul etc., pot substitui petrolul prin producerea alcoolilor, sau pot produce... energie. De exemplu, un hectar de grîu cu o recoltă de 6,6 t boabe şi 5,3 t paie, produce o cantitate de energie egală cu 4,70 tone echivalent petrol — „tep", şi consumă pentru cultură, recoltare şi îngrăşăminte, precum şi pentru carburanţi, producerea seminţelor, fabricarea maşinilor şi tratamente fitosanitare, o cantitate de energie reprezentînd doar 0,67 tep (tonă echivalent petrol).

„Beefsteakul vegetal"

Creşterea plantelor şi ca urmare producerea proteinelor vegetale este incomparabil mai uşoară decît creşterea animalelor şi producerea proteinelor animale. Aceasta face ca, de pildă, proteinele produse de soia să fie mai ieftine decît proteinele din carne de 10 ori, iar faţă de cele din lapte de 6 ori. În plus, am văzut că nu numai proteinele din soia, dar şi cele din rapiţă colza şi tutun, egalează în calitate proteinele animale. Aceste două foarte însemnate proprietăţi ale proteinelor vegetale: calitatea şi ieftinătatea, le fac, iar cerinţele economico-sociale le impun ca o materie primă alimentară foarte valoroasă.

De o atenţie deosebită s-au bucurat proteinele din boabele de soia, care, datorită cantităţilor şi raporturilor dintre aminoacizii esenţiali, depăşesc calitativ multe dintre speciile proteice. În general, proteinele pot fi folosite în alimentaţie direct, ca făinuri adăugate, de exemplu, la prepararea pîinii sau, indirect, prin prelucrare industrială. Pînă nu demult prin prelucrare industrială din boabele de soia se producea margarină, lapte, lecitină. Cantitatea şi calitatea proteinelor şi grăsimilor bobului de soia sînt factori care au determinat diversificarea prelucrării industriale a bobului, inclusiv punerea la punct a unei tehnologii menite a asigura producerea unor preparate asemănătoare cărnii. Aşa a ajuns în actualitate problema „beefsteakului vegetal" sau „beefsteakul verde".

Soia, ca şi alte surse similare de proteine vegetale, este utilizată încă în cea mai mare proporţie în furajarea animalelor (97% în S.U.A.). Se speră însă că prin diferite căi, alternativa „soia în alimentaţia umană" va asigura reorientarea oamenilor, atît în ţările în curs de dezvoltare, cît şi în ţările dezvoltate. Fabricarea „cărnii" din proteine vegetale, în amestec sau nu cu proteine animale, prin tehnici perfec-

ționate care să asigure un gust și un aspect caracteristic, va face din „beefsteakul" sau „baconul verde" (costiță, slănină) o componentă de bază a alimentației dietetice și una obișnuită în alimentația normală.

SĂ NU UITĂM PISCICULTURA!

Importanța produselor obținute de la oi, păsări de curte, este vitală pentru omenire și recunoscută ca atare. De asemenea se cunoaște aportul însemnat al pescuitului la completarea sau susținerea rațiilor alimentare ale unor populații numeroase cu proteine animale. În acest context exemplele ce urmează au ca scop doar să releve perfecționări în tehnologiile de creștere și în ameliorarea genotipului și efectele acestora pe plan alimentar al protecției mediului.

10 000 kg crap la hectar

...un randament de 20 de ori mai mare decît producția medie de pește obținută la un hectar de eleșteu în țările Europei. Producții de 10 tone/ha de crap se obțin curent în R.P. Chineză, în care producția medie se ridică la peste 3,5 tone la hectarul de eleșteu.

O recoltă atît de ridicată are la bază o tradiție îndelungată de creștere a crapului, o observație și cunoaștere temeinică a vieții peștilor de apă dulce, precum și aplicarea unor tehnologii științifice în înmulțirea, creșterea și întreținerea peștilor (și întreținerea apei din lacuri). Dintre speciile de pești de apă dulce (peste 500) piscicultorii chinezi au avut norocul și priceperea să selecționeze patru. Acestea sînt specii mai mult sau mai puțin înrudite cu crapul. Interesant este faptul că aceste specii trăiesc normal în marile fluvii ale Chinei, dar ele cresc perfect și în eleștee, dacă sînt capturate din mediul natural în stadiul de alevini (puiet).

Iată aceste specii și cracteristicile lor[1], care fac ca reprezentanții lor să crească în aglomerări exagerate, ceea ce a determinat pe unii piscicultori să asemuiască eleșteele ocupate de ele cu crescătoriile de animale de curte (găini, porci):

— „crapul ierbivor" care, așa cum indică și numele, se hrănește mai ales cu plante acvatice, dar acceptă la fel de bine plantele terestre;

— „crapul argintiu", consumă cu lăcomie fitoplanctonul, plante uni și pluricelulare, reprezentate mai ales de algele care se înmulțesc la suprafața apei;

— „crapul cu cap mare", are un regim carnivor, hrănindu-se cu zooplanctonul din eleștee, reprezentat de animale nevertebrate mici;

— „crapul negru", se hrănește, aproape în exclusivitate, cu moluște, melci sau midii de apă dulce.

Pentru aceste caracteristici „crapul chinezesc", reprezentat de ansamblul celor patru specii, este numit și „porc" acvatic, dar care are un randament de transformare de trei ori mai mare comparativ cu porcul.

Popularea eleșteelor cu aceste patru specii cu hrănire diferită reprezintă „revoluția chineză" în materie de piscicultură. Fiecare specie caută altă hrană folosind alt nivel trofic al apei, ca urmare, nici vorbă de concurență între ele, de unde numărul mare de indivizi la unitatea de volum și „suprapopularea" firească, normală. În plus, apa rămîne aerată și curată. Spre deosebire, în eleșteele populate cu o singură specie, obișnuit carnivoră, în lipsa exploatării tuturor nivelelor trofice, apa se încarcă cu viețuitoarele neconsumate, se poluează treptat, iar eleșteul se eutrofizează. Aceasta este cauza producțiilor mici, a dispariției speciilor valoroase și a scoaterii din utilizare a multora din eleșteele europene.

Din cele menționate rezultă că un eleșteu chinezesc, deși artificial, dar bine controlat biologic, este un ecosistem echilibrat, care oferă condiții excepționale pentru dezvoltarea și interacțiunea favorabilă reciprocă a tuturor elementelor biotice și abiotice. În R.P. Chineză se speră într-o îmbunătățire chiar a producțiilor atît prin ameliorare (selecția unor

[1] Lecomte J., *Les carpes dans la basse-cour*, în „Science et Vie", Nr. 759, XII, Paris, 1980.

specii noi sau producerea hibridării controlate), cît și prin îmbunătățirea tehnologiilor de creștere. De acum s-au adus multe îmbunătățiri. Astfel, după 1958, treptat, pentru stimularea pontei (producerea de icre-ovule, gameți femeli) și a cantității de lapți (spermatozoizi — gameți masculi) genitorii de ambe sexe „de profesie", mai în vîrstă (de la 3 la 5 ani) capturați din fluvii sînt injectați cu hormoni (din hipofiza peștilor, din placentă umană sau sintetici). Lapții sînt „mulși" de la masculi și folosiți la fecundarea icrelor în condiții naturale sau artificiale. În condiții artificiale, ouăle fecundate sînt plasate în bazine cu apă curgătoare pentru asigurarea incubării și eclozíunii într-un mediu cu oxigenare optimă. Timp de doi, trei ani după ecloziune se schimbă bazinele pentru asigurarea creșterii. Mărimea comercială este în medie de 700 g.

Noua tehnologie asigură producții constante de la un an la altul. În bazinele pentru creșterea alevinilor (creșterea se face pe specii pentru a evita competiția pentru hrană) se administrează îngrășăminte organice (gunoi). Este stimulată astfel producerea fitoplanctonului și a zooplanctonului, care reprezintă hrana principală a alevinilor. Aceste îngrășăminte organice sînt preparate după rețete speciale: din anumite specii de plante, dejecțiile de la anumite specii de animale sau alte deșeuri organice. După ce alevinii ating 3 cm lungime se pot amesteca, pentru că ei încep să utilizeze hrana specifică. Or, tocmai în această perioadă (pînă ating 30 cm lungime) fertilizarea bazinelor joacă un rol major. Hrana administrată, de diverse tipuri, prin ingerarea de către pești este transformată în proteine. În eleșteul final de 2—3 m adîncime, cu suprafețe variabile, se administrează gunoi de plante, de la animale și om. Chiar dejecțiile crapului ierbivor, care nu digeră complet plantele, reprezintă sursă de hrană pentru specia care se hrănește cu fitoplancton etc... Un dicton chinez afirmă: „hrănirea a trei crapi ierbivori asigură hrana și pentru trei alți pești"). Dejecțiile porcine ocupă un loc central socotindu-se că deșeurile de la 15 animale pot fertiliza convenabil un hectar de eleșteu. De altfel, se apreciază că orice hrană (inclusiv cerealele) este utilizată de pești, cu un randament sporit, peștele fiind un bun transformator. Astfel, în timp ce pentru o megacalorie ingerată (de cereale) vaca produce 2 g proteine, porcul 6, puiul de găină 10, peștele produce nici mai mult nici mai puțin decît 20 g proteine.

Pe cînd o asemenea piscicultură în Europa?

O mare premieră științifică: păstrăvul bisexuat

Animalele vertebrate sînt unisexuate: sexele sînt repartizate pe indivizi separați, iar proporția dintre indivizi este de circa 50 ♀ : 50 ♂. La om, mamifere, musculițe de oțet (*Drosophila*) etc. bărbatul produce două tipuri de spermatozoizi: 50% posesori ai cromozomului sexului X, 50% posesori ai cromozomului sexului Y. Spre deosebire, femela formează un singur tip de ovule: purtătoare a cromozomului X. De unde la fecundare: ovul X + spermatozoid X = XX individ de sex femel, iar ovul X + spermatozoid Y = XY individ mascul. La pești, păsări, fluturi etc. sexele au o structură a cromozomilor sexului inversată și anume: femela produce două tipuri de ovule în proporții egale: 50% ovule cu cromozomul sexului Z și 50% ovule cu cromozomul sexului W, în timp ce masculul produce un singur tip de spermatozoizi, toți avînd un cromozom Z. Deci, la fecundare: ovul Z + spermatozoid Z = ZZ individ mascul, iar ovul W + spermatozoid Z = ZW individ femel.

Așadar, la pești, inclusiv la păstrăv, indivizii de sex femel au cromozomii sexului ZW, iar masculii ZZ. Prezența acestor cromozomi în structurile menționate determină sexul genetic. La expresia fenotipică a sexului contribuie cromozomii sexului și hormonii produși de organele sexuale.

În paragraful anterior am făcut cunoștință cu faptul că peștii femele produc icre-ovule (gameți femeli) care sînt 50% Z și 50% W, iar peștii masculi lapți 100% spermatozoizi Z. Ambele tipuri de gameți, icrele și lapții, sînt depuse în mediul extern acvatic în care are loc fecundarea, incubarea, ecloziunea și apariția puietului (alevinii). Dar, în mediul natural, cu toate că indivizii-femele depun cantități uriașe de ovule (speciile de crap, în medie, între 600 000 și 1 500 000 ovule/individ) doar un număr neînsemnat de indivizi reușesc să învingă numeroasele pericole care-i pîndesc în fiecare clipă și la tot pasul și să supraviețuiască pînă la maturitate. Cu

deosebire icrele şi lapţii, ca şi ouăle fecundate şi alevinii sînt foarte vulnerabili şi deosebit de dăunaţi. Supravieţuitorii acestor stadii iniţiale, fiind mai adaptaţi la efectele dăunătoare ale factorilor care acţionează în cadrul luptei pentru existenţă, ajung în bună măsură la maturitate comercială sau sexuală. Tocmai pentru a asigura fecundarea şi ecloziunea marii majorităţi a ovulelor, precum şi supravieţuirea puietului pînă la stadiul cînd la fiecare individ se dezvoltă instinctul autoapărării şi adaptării la condiţiile mediului de viaţă, piscicultorii sînt obligaţi să realizeze producerea şi creşterea alevinilor în bazine special amenajate şi controlate. Aceste operaţii sînt dificile şi scumpe.

În acest context, realizarea de către o echipă de cercetători condusă de B. Chevassus, de la I.N.R.A.-Franţa, a păstrăvului bisexuat-hermafrodit fertil, care realizează atît icre cît şi lapţi şi depune ouă fecundate, apare nu numai ca o mare premieră ştiinţifică, ci şi ca un mare beneficiu pentru salmonicultură (creşterea păstrăvilor) — se suprimă primele stadii din producerea alevinilor. Încercări pentru obţinerea la broaşte şi la peşti a inversiunii complete şi funcţionale a sexului (schimbarea sexului femel în mascul şi reciproc) au fost numeroase, începînd, mai ales, din 1944. În acest scop au fost utilizaţi hormoni steroizi, dar niciodată nu s-au obţinut hermafrodiţi adevăraţi şi fertili.

Echipa de cercetători de la I.N.R.A. şi-a început activitatea în 1972. Într-o primă fază au fost obţinuţi, în scopuri economice, fie indivizi masculi, fie femele, dar sterili. Compararea acestor indivizi cu indivizi sexuaţi natural (fertili masculi sau femele) a dus la constatarea că ultimii, în anumite perioade ale anului, îşi încetează creşterea şi devin pentru scurte perioade de timp mai sensibili la numeroase boli. De aici ideea populării eleşteelor şi lacurilor montane, în vederea evitării pierderilor în greutate din cauza competiţiei între peştii maturi reproducători şi descendenţa lor, fie a unor indivizi sterili, fie doar a unor indivizi dintr-un singur sex (mascul sau femel). Aceşti păstrăvi ating greutatea comercială fără a fi dăunaţi de factorii menţionaţi. Ulterior s-a constatat că nici păstrăvii bisexuaţi nu suferă de factorii care influenţează negativ indivizii normali sexuaţi.

Să cunoaştem ciclul vital al păstrăvului curcubeu, luat în cercetare, cu sexele separate: ZW ♀ şi ZZ ♂. La această specie, ovulele şi lapţii emişi în apă (între lunile noiembrie şi martie) se fecundează. După o lună de la fecundare ouăle eclozionează dînd naştere alevinilor. Aceştia pot creşte timp de o lună pe baza rezervelor proprii de vitelus provenite din ou, apoi încep să caute singuri hrana. În cursul celei de a doua luni de viaţă puietul ia forma caracteristică de păstrăv cînd manifestă primele diferenţieri sexuale. După doi ani masculii şi după trei ani femelele ajung la maturitate sexuală.

Pentru tratarea cu hormoni sexuali au fost folosiţi alevini intraţi în cea de a doua lună de viaţă cînd încep să se hrănească. Hormonii steroizi (estronă — foliculină, pentru orientarea alevinilor de sex mascul spre cel femel sau testosteron care orientează alevinii femele spre sexul mascul) au fost introduşi în hrană care a constat într-un amestec de făinuri şi uleiuri vegetale şi animale. Tratamentul a durat cinci luni. La vîrsta de doi ani animalele au fost sacrificate şi cercetate în privinţa organelor şi produselor sexuale. Rezultatul: în loc de 50% ♀ şi 50% ♂ cum se obţine în stare naturală, din alevinii trataţi cu estronă au rezultat: 54% femele, 9,9% masculi, 5,6% indivizi sterili şi 30,5% hermafrodiţi cu glande sexuale mascule şi femele funcţionale. Din alevinii trataţi cu testosteron au rezultat: 58,3% masculi, 18,3% femele şi cîte 11,7% indivizi hermafrodiţi şi sterili. Înseamnă că la tratamentul cu estronă 4% din alvini, deşi aveau perechea de cromozomi ZZ, deci erau genetic masculi, au devenit femele, iar 30,5%, tot cu structura ZZ, au devenit funcţional bisexuaţi şi numai 9,9% au rămas masculi puri. Tratamentul cu testosteron a transformat în masculi 8,3% din alevinii-femele (cu structura ZW; restul de 50% au formula normală ZZ), 18,3% au rămas femele (cu structura ZW), iar 11,7% au devenit hermafrodiţi funcţionali (deşi aveau structură genetică femelă ZW).

Pînă la experienţele echipei franceze nu au fost obţinuţi bisexuaţi funcţionali, probabil, fie din cauza aplicării neadecvate a hormonilor, fie din cauză că tratamentul a fost aplicat asupra unor alevini diferenţiaţi sexual. Aşa cum am menţionat echipa franceză a tratat cu hormoni alevini nedi-

ferențiați sexual, la debutul celei de a doua luni de viață, cînd aceștia încep să utilizeze hrană din mediu (în cazul experiențelor citate hrana a fost preparată și administrată controlat timp de cinci luni). Așa se explică faptul că alevini genetic masculi, ZZ (sub influența estronei) și alevini genetic femele, ZW (sub influența testosteronului) au evoluat spre bisexualitate funcțională.

Păstrăvii bisexuați pot servi în mod remarcabil activitatea de ameliorare: de exemplu, pentru asigurarea manifestării unor gene de rezistență, pentru transferul unor gene utile, pentru obținerea unor linii pure, fie femele, fie mascule, cu alelele în stare homozigotă. Liniile pure cum am afirmat pot fi folosite în producție dar mai ales pot fi folosite, ca și la porumb, sorg, floarea-soarelui etc. sau găini, curci, vierme de mătase etc., la producerea controlată a unor descendenți hibrizi F_1, care manifestă vigoare hibridă ridicată și adaptabilitate la mediu. S-a calculat că prin autofecundare păstrăvul bisexuat asigură obținerea unor linii pure doar în 3 generații (2 ani generația → 6 ani). Or, prin consangvinizare între frați și surori, produși de indivizi normali, unisexuați, sînt necesare 10 generații (la 2—3 ani pe generație → 20—30 de ani). Așadar în cazul păstrăvului și a altor specii de pești similare este posibil ca viitorul crescătoriilor cu scop comercial să fie dominat de hibrizi de primă generație produși prin hibridarea controlată a unor linii pure rezultate din genitori cu bisexualitate indusă.

PRODUCĂTORI MICI ȘI MARI

Algele — fabrici de substanțe nutritive

În ultimii ani algele au devenit „vedete" ale lumii vegetale. Lăsăm la o parte faptul că aceste plante, micro sau macroscopice, au importanță esențială pentru biosferă și că fără ele, în oceane, nu ar exista viață (și nici în alte medii dacă ne gîndim că algele produc peste 70% din oxigenul Terrei). Ne interesează mai ales potențialul lor de a fabrica

substanțe organice în cantități uriașe, fapt sesizat recent, și care le-a adus în centrul atenției cercetării. Și în prezent capacitatea de creștere și producție a algelor este exploatată, direct de către fauna acvatică care le folosește drept hrană și indirect, prin prelucrare, mai simplă sau mai complexă, în agricultură, industrie, farmaceutică, în hrana oamenilor.

Cantitatea de alge folosită direct în interesul umanității este încă extrem de mică: din oceane se extrage anual doar în jur de un milion de tone de alge (din această cantitate în Japonia s-au extras între 285 000—300 000 tone alge brune: *Laminaria* și *Undaria* și circa 254 000 tone alge roșii). Prin cultură marină, în bazine amenajate sub cerul liber sau protejate ca și prin culturi în bioreactori, cu influențarea pozitivă a condițiilor de mediu, selecția și ameliorarea genetică a formelor cultivate, s-ar putea spori sensibil producția și recolta de alge. Potrivit unor experiențe și calcule, realizate în stațiuni pilot anume amenajate, climatizate, luminate, aerate și fertilizate controlat la nivel optim, în 160 de zile (mai-octombrie) algele au produs 36,5 tone substanță uscată la suprafață de un hectar. Și acum utilul: 50% din conținutul acestei producții era constituit din proteine. Deci, la un hectar cultură de alge într-un sezon agricol, peste 18 tone proteine, cît de pe 36 hectare cultivate cu porumb cu o producție de 5 000 kg/ha (cu 10% proteine). Se apreciază că în construcții speciale de tipul serelor, cu suprapunerea bazinelor și asigurarea unor condiții optime de mediu, în așa-numite „uzine de alge" se va putea obține o producție de alge de 150 g/m²/zi, circa 55 kg/m²/an sau fabuloasa producție de circa 550 t/ha/an din care circa 275 t proteine și chiar peste 385 pînă la 400 t proteine la hectar (cît de pe o suprafață de peste 500 pînă la 800 hectare de porumb cu o producție medie de 5 000 kg/ha).

Forța cifrelor este o pledoarie perfectă în sprijinul producerii algelor în uzine speciale, chiar la un randament înjumătățit al producției acestora. Pînă atunci pentru cultura algelor rămîn la dispoziție lacurile și mările, oceanul planetar.

Ce conțin algele în substanța uscată? Circa 50% proteine, 1,2% grăsimi, 10 — 12% hidrocarbonate, 7 — 8% cenușă. Calitatea și digestibilitatea proteinelor din alge la unele specii este foarte ridicată. Să vorbim despre *Spirulina maxima*. Calitățile nutritive ale acestei alge au fost descoperite în

veacul al XVI-lea de către azteci, în America, și de către băștinașii ce trăiesc pe malurile lacului Ciad, din Africa. Este interesant de menționat că botanistul belgian J. Leonard, participant la o expediție transsahariană, a luat cu el, la întoarcerea în țară, turte preparate din această algă. Supunîndu-le analizei, a constatat cu surprindere că au un conținut extrem de ridicat de albumină — pînă la 70%. În plus, calitatea acestei albumine este superioară. În timp ce *Chlorella vulgaris*, o altă specie algală, propusă pentru hrana oamenilor și a animalelor, are o membrană groasă de celuloză, greu digerabilă (asimilabilă) de către organismul uman, *Spirulina* are un perete celular subțire, ușor digerabil și asimilabil. Un alt avantaj al spirulinei este acela că poate crește și se poate înmulți perfect în mediu alcalin, în care alte organisme nu pot să se dezvolte.

În proteinele algale sînt prezenți toți aminoacizii esențiali: 4—5% lizină, 5—6% histidină, 9—10% arginină și alanină, 1—2% serină, 2—3% glicină și treonină, 3—4% acid glutamic și acid aspartic etc., pînă la proporția de 46—47%. Aceasta face ca valoarea nutritivă a proteinelor din alge să nu fie mai prejos decît a proteinelor din ouă, egală cu aceea din laptele praf și, în general, apropiată de valoarea proteinelor din carne.

Alături de algele proteice există și alge „grase". De exemplu, alga *Rhabdonema adriaticum*[1] conține în celulă 34% grăsimi, iar alga *Scenedesmus acutiformis* poate acumula în celulă între 14—35% grăsimi (printre care la diferite alge: fucosterol, sargasterol, colesterol ș.a.). Alte alge sintetizează și depozitează cantități însemnate de polizaharide între 10—15% din substanța uscată. (în special, acid alginic cu sărurile sale, metalice și derivații organici, indicați prin denumirea de alginați, printre care agarul, caraghenul, precum și glucani, fucoidină, laminarină, manitol etc.). Algele mai conțin vitamine (A, B_2, B_6, C, D, PP etc.) și cantități mari de cenușă, care pot ajunge la 18—20% (la *Fucus*) și chiar la 60% (la *Padina pavonia*). În cenușă se găsesc cantități mari, variabile, de sodiu, iod, potasiu, calciu, magneziu, mangan, brom ș.a.

---

[1] Ionescu A.I., *Algele — proteinele viitorului*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1980.

Producțiile mari și un asemenea conținut bogat în substanțe, fac din alge o materie primă excepțional de valoroasă. Menționăm că, anual, în lume se realizează o producție de circa 30 000 t alginați extrași mai ales din specii din genurile *Laminaria, Macrocystis* și *Ascophyllum* și peste 2 000 t de agar extras din specii din genurile *Gelidium* și *Eucheuma*. De altfel alginații au o deosebită valoare în industria alimentară a vinului și a laptelui ș.a. Astfel, sînt utilizați pentru gelificare, emulsionare, cristalizare, în creme, supe, geleuri, mezeluri, conserve, cașcaval, băuturi, șerbet, aspic, înghețată, gumă de mestecat etc., etc. Alginații se folosesc, de asemenea, în diferite preparate cosmetice și farmaceutice, în industriile textilă, hîrtiei (peste 100 000 tone de alge anual), pielăriei, șlefuitului (300 000 t anual de kiselgur extras din peretele celular al diatomeelor sedimentate), fotografică ș.a. Alginații sînt utilizați și în cercetarea științifică, mai ales în perpararea mediilor solide pentru culturile diverselor organisme sau celule *in vitro*, în diverse analize și teste, în fixarea materialelor ce urmează a fi examinate microscopic.

Agricultura poate folosi algele ca îngrășămînt organic. O mie tone de alge brune în stare umedă conțin 80—90 t alginați, 40 t săruri de potasiu, 30 t de alte săruri minerale, o tonă de iod și 1/2 tonă de brom, precum și fier, cupru, zinc, mangan, toate substanțe sau elemente utile pentru fertilizarea solurilor agricole. Extragerea industrială a acestor compuși ridică sensibil valoarea produselor și îmbunătățește modul de dozare și administrare. În plus, în orezării, algele albastre (*Nostoc, Anabaena* ș.a.), fixatoare de azot, sintetizează (la hectar) circa 130 kg/azot/an.

Pe lîngă utilizarea proteinelor algale în hrana oamenilor, inclusiv sub formă de „carne", de „pîine" ș.a., proteinele extrase sau algele preparate adecvat pot constitui furaje valoroase pentru animale. Multe țări riverane oceanelor recoltează alge, le prepară în nutrețuri și le administrează în alimentația tuturor speciilor animale. Așa se procedează în Japonia, S.U.A., Norvegia, U.R.S.S., Filipine, Noua Zeelandă ș.a. Efectele alimentației cu alge marine *Cystoseira, Phyllophora* ș.a.) sau de apă dulce a animalelor domestice au fost studiate și în România.

O uzină vie — alga Porphyridium purpureum

Echipa de cercetători condusă de C. Gudin, de la Laboratorul de heliosinteză a BP-Lavera, într-un „bio-foto-reactor", de fabricație proprie, a relevat un fapt ieșit din comun: alga roșie monocelulară, *P. purpureum*, reacționează la „pericol". Astfel, în fața unui pericol iminent această algă secretă și se înconjoară cu polizaharide, produse deosebit de valoroase, foarte căutate în industria alimentară, care pot fi utilizate în prepararea cremelor glasate, torturilor, cremelor de lapte etc.

Prin reacția la pericol alga *Porphyridium* se comportă ca o adevătară uzină vie, care, potrivit cercetărilor, fabrică polizaharide continuu, 24 de ore din 24. Cum se simulează pericolul? Prin schimbarea ciclului zilelor și a nopților, prin privarea algei de azot, prin includerea algei într-o teacă de poliuretan care o împiedică să se reproducă.

Bio-foto-reactorul în cauză este reprezentat de un tub de sticlă de 5 cm diametru, înalt de 2 m, fixat vertical între două becuri de neon care reproduc spectrul luminii solare și constituie sursa de energie. În interiorul tubului se plasează cuburi de mușchi în poliuretan în care se află celulele algale. Acestea se găsesc în apă de mare reînnoită permanent de un curent continuu, cu o compoziție nutritivă atent dozată. De asemenea, se asigură permanent carbonul indispensabil activității algei. Prin penetrarea cuburilor de mușchi din bioreactor lichidul realizează și o antrenare a polizaharidelor pe măsura sintetizării. Celula fabrică polizaharide permanent pentru a țese în jurul ei o protecție pe care nu reușește să o obțină însă niciodată. Randamentul unui asemenea sistem de producție este evaluat la 50 — 100 t/an/hectar. Prețul acestor polizaharide sintetizate de *Porphyridium purpureum* fiind scăzut recomandă sistemul de a fi aplicat industrial. Ieftinătatea derivă din consumul mic de energie și de materii prime (CO_2 poate fi recuperat, iar energia provine de la soare).

Folosirea altor alge în acest sistem, denumit „producție controlată și continuă de biomasă exocelulară", poate asigura producerea și a altor substanțe, de exemplu, glicerol, amidon, hidrocarburi și diverse proteine. Acest sistem industrial aparține viitorului.

Producții bacteriene

Este de la sine înțeles că în fermentatori se vor cultiva și bacterii, fapt subliniat într-un capitol anterior. În viitor, în mediu controlat, bacteriile vor putea produce orice proteină și multe alte substanțe. Sinteza acestor produse diverse va fi posibilă prin „programarea bacteriilor" în urma transferului în acestea a unor gene străine, atît de la specii de animale cît și vegetale, deoarece codul genetic, așa cum s-a menționat, este universal. Bacteriile manipulate vor începe să fabrice proteine sau alte substanțe dorite, care, firește, vor fi total străine de patrimoniul genetic normal. Au fost menționate manipulările care permit sinteza somatostatinei, insulinei, proinsulinelor, timozinei, interferonului ș.a. Trebuie însă să precizăm că la bacterii a fost transferat, de exemplu, și un segment de ADN de la găină. Rezultatul: bacteria manipulată are proprietatea de a fabrica ovalbumină, unul dintre principalii componenți ai oului de găină.

Proiectele de viitor ale geneticienilor includ, pe lîngă perfecționarea proceselor de producere de către bacterii a insulinei umane, a interferonului etc., și manipulări genetice menite să asigure sinteza unor proteine ieftine destinate furajării animalelor, precum și producerea, pe lîngă noi antibiotice, a unor vaccinuri antivirale, precum și alte substanțe a căror sinteză este controlată genetic direct de către gene ce pot face obiectul transferului genetic.

PRODUSE NATURALE VEGETALE ÎN BIOREACTORI

Fără pămînt, în bioreactori industriali, celule și țesuturi prelevate de la diverse plante superioare, și plasate în cultură *in vitro*, în condiții optime de creștere, diviziune și biosinteză, vor putea produce cantități mari de biomasă bogată în diverși *metaboliți secundari*. Astfel, culturile de celule și țesuturi vor putea produce substanțe naturale farmaceutice (alcaloizi, cumarine, furancromi, flavonoide, saponine, steroli, antocianine, chinone, carotenoide, terpene, ule-

iuri esențiale, glicozizi cardiaci și cianogenici etc.), substanțe naturale biologic active (citotoxice, antitumorale, antibacteriene, antifungale, cardiovasculare, hormoni, digestive, antialergice, antiinflamatorii.)

Spre deosebire de metaboliții secundari, *metaboliții primari* sînt zaharurile, aminoacizii, acizii grași, acizii din ciclul acidului citric, pirimidinele și purinele și derivații și polimerii lor fundamentali, cum sînt polizaharidele, proteinele, acizii nucleici și grăsimile, precum și vitaminele. Acești produși sînt esențiali pentru viață și apar în orice organism. Ca urmare, încă de la înființare, cultura plantelor și-a propus, în mod indirect prin producerea și recoltarea boabelor, fructelor, tulpinilor, rădăcinilor și altor organe vegetale (inclusiv pentru producția de fibre), să obțină cantități mai mari decît cele oferite de natură de proteine, zaharuri, amidonuri, grăsimi și vitamine, constituenții nutritivi cei mai importanți ai plantelor. Tot în mod indirect, prin îndelungata selecție empirică a unor plante mai productive, se influența și conținutul în aceste substanțe. Abia o dată cu științizarea activității de creare de noi genotipuri după formularea principiilor eredității și descoperirea mecanismelor controlului genetic al sintezei și evoluției acestor substanțe în plante, metaboliții primari au devenit obiective concrete ale programelor de ameliorare.

Așadar, obiectivele principale ale agriculturii și ameliorării: producerea în cantități sporite, îmbunătățite calitativ, a substanțelor din grupa metaboliților primari. În acest context agricultorii ca și amelioratorii nu au acordat atenție celorlalte substanțe produse de către plante și cunoscute sub denumirea de metaboliți secundari. Cauza? Funcțiile acestora nu sînt nici în prezent bine cunoscute și înțelese, iar contribuția acestor constituenți asupra calității majorității principalelor plante de cultură nu a fost estimată în mod adecvat. Metaboliții secundari apar în cantități ușor detectabile numai în anumiți taxoni și nu numai că rolul lor în majoritatea cazurilor nu este cunoscut precis, dar concentrațiile ridicate ale multor asemenea produși naturali sînt toxice asupra celulelor și organismelor. Plantele care acumulează metaboliți secundari îi translocă din locul de sinteză și-i depozitează în vacuole, în cavitățile lizigene și schizogene, în vase conducătoare sau sînt excretate prin porii glandulari

ori prin cuticulele frunzelor și tulpinilor tinere. În unele cazuri acești produși naturali sînt depozitați în țesuturi moarte, în tulpină sau scoarță.

În general, distincția între cele două categorii de metaboliți nu este categorică, mai ales că unii constituenți esențiali pentru viață, cum sînt vitaminele, unele coenzime, tetrapirolii, sterolii și carotenoizii sînt sintetizați pe căi metabolice secundare. Ca urmare, se admite că este util ca printre metaboliții secundari să fie incluși produșii naturali, rezultați din căi metabolice periferice și care, fiziologic, sînt mai mult sau mai puțin inerți și sînt depozitați în diverse forme în corpul plantelor sau sînt excretați.

Cu privire la utilizarea metaboliților secundari merită precizate următoarele: compușii polifenolici, cu structură și masă moleculară distinctă, așa-numitele taninuri, apar în cantități mari în plante sau părți ale acestora și sînt utilizate la tăbăcirea pieilor. Mulți produși naturali vegetali, cu structuri foarte variabile, sînt extrem de toxici pentru insecte, pești, bacterii, ciuperci ș.a. sau au efecte citostatice. Plantele produc numeroase substanțe colorante cum sînt flavonoidele, antrachinonele, fenilpropanoizii, carotenoizii și betalainele. De-a lungul istoriei omul a utilizat mirodenii și condimente pentru a da mîncărurilor miros, aromă și gust plăcut, mai ales că multe mirodenii posedau și proprietăți antiseptice. Acestea depind mai ales de substanțele fenolice cum este acidul rozmarinic din plantele familiei *Labiatae* sau eugenolul din usturoi (pînă la 20% din căpățînă). Mirosul și aroma sînt date de acizii esențiali, volatili cum sînt fenilpropanoizii, monoterpenele și sescviterpenele. Gustul picant al ardeiului și piperului este dat de capsaicine, tot din grupa uleiurilor esențiale. La fel de vechi ca și mirodeniile sînt și substanțele utilizate în prepararea cosmeticelor: grăsimi, ceruri, rășini, uleiuri și substanțele colorante .

Medicina modernă a fost puternic impulsionată de utilizarea produselor naturale ale plantelor. Fie prin extragerea din plante, fie prin imitarea produselor plantelor, laboratoarele și industriile farmaceutice au preparat majoritatea agenților terapeutici. Să menționăm doar alcaloizii cocaina, morfina, chinina, a substanțelor psihotrope și antitumorale, pre-

cum și a colchicinei (citotoxică, antimitotică, antigutoasă, anticanceroasă, poliploidizantă) și ne putem reprezenta rolul pentru știință, genetică, medicină, farmaceutică etc. a produselor naturale din plante.

Produși utili prin culturi *in vitro*

Numeroase sînt dificultățile care impun modalitatea producerii *in vitro* prin culturi de celule și țesuturi a unora dintre produșii fitofarmaceutici și naturali utili. Dintre dificultăți menționăm: scăderea drastică a resurselor vegetale, exploatarea nerațională a florei spontane, poluarea sau alterarea metaboliților secundari prin administrarea pesticidelor în cultura plantelor medicinale și aromatice, precum și multe de ordin tehnic și economic (recoltare, prelucrare primară, depozitare, transport ș.a.).

Cultura *in vitro* a celulelor și țesuturilor, bazată pe capacitatea acestora de a se înmulți, dar mai ales pe prezervarea mai mult sau mai puțin intactă a proprietății de a produce unii dintre metaboliți, are avantajul că: 1) sinteza se desfășoară în condiții controlate de mediu, independent de influențele pedoclimatice; 2) productivitatea sintezei poate fi îmbunătățită prin controlul creșterii celulelor și reglării proceselor metabolice; 3)se pot utiliza celule sau organe prelevate de la plante producătoare originare din orice regiune a lumii. Cultura *in vitro* poate asigura condiții optime, ferite de influența factorilor abiotici sau biotici stresanți; 4)aplicarea selecției și a metodelor de ameliorare asupra celulelor clonate poate asigura detectarea rapidă a unor genotipuri superproducătoare a unuia sau altuia dintre metaboliții luați în considerație.

Despre rolul ereditătii în controlul producerii diverșilor metaboliți datele existente sînt concludente. De exemplu, la specia *Chamomilla recutita* cercetările au relevat că transmiterea caracteristicii: „prochamazulenă liberă" se transmite dominant, în timp ce „prezența bisabololului" este recesivă față de lipsa acestui drog. La specia de mac *Papaver bracteatum*, sursă de producere a tebainei (paramorfină, alcaloid izolat din opiu și folosit ca intermediar în sinteza mai multor medicamente) au fost evidențiate variațiile chimice și au fost

stabilite criterii adecvate pentru un progres rapid al ameliorării. În acest scop au fost analizate numeroase surse stabilindu-se conținutul în tabaină. S-a ajuns la concluzia că progresul genetic în privința conținutului în tebaină al capsulei poate ajunge pe generație la 24%, iar a greutății medii (a capsulei) la 25%. Exemplificînd cu ardeiul, *Capsicum annuum*, merită arătat că prin inducerea mutațiilor au putut fi detectate mutante care produceau o cantitate mare de capsicină, cu 20 la 60% peste conținutul tipului parental (cu reducerea conținutului de pigmenți din fruct care împiedică extragerea capsicinei).

Producerea substanțelor utile *in vitro* este posibilă în două sisteme: pe mediu solid (static) și în mediu lichid (submers sau în suspensie). Aceste medii aseptice, cu temperatură și lumină controlată, se inoculează cu explante sănătoase, prelevate din diferite plante și organe sau cu celule specializate, în vederea incubării și producerii calusului.

Acest calus reprezintă sursa de material producător, cu care, direct sau prin subculturi, se înființează cultura producătoare. Pentru aceasta în mediul de cultură se introduc macro- și microelemente, vitamine, o sursă de carbon, substanțe de creștere (auxine, citokinine, gibereline, precum și caseină, extract de drojdie, lapte de nucă de cocos ș.a.). Componentele mediului se stabilesc în funcție de cerințele speciilor vegetale din care au fost prelevate celulele și țesuturile în cultură și de metabolitul sau metaboliții care urmează a fi produși.

În bioreactori sau fermentatori, culturile de celule, libere sau în agregate, se realizează, obișnuit, în mediu lichid, în suspensie, mișcată controlat și aerată. Sistemul, comparativ cu mediul solid, static, are avantaje evidente și anume: asigură o creștere și multiplicare mai rapidă, suspensia este mai omogenă, iar diferențierea celulelor mai redusă, desfășurarea culturii poate fi ținută sub control strict, producerea metaboliților poate fi stimulată prin administrarea precursorilor, iar volumul bioreactorilor poate fi net superior, pînă la mii sau chiar zeci de mii de litri. Culturile în bioreactori pot fi continuui cînd se asigură inoculului (celulelor) condiții ideale pentru creștere și diviziune sincronă. Pentru aceasta mediul se împrospătează permanent, ținînd seama de crește-

rea și diviziunea celulelor (de ciclul celular), de metabolismul general al celulelor și de momentul sintezei metabolitului util urmărit. Succesul culturilor și producerea *in vitro* a unor produși naturali utili depind de realizarea unei distribuții uniforme a celulelor în bioreactor, prin amestecarea mediului și culturii și asigurarea unui schimb de gaze adecvat între mediul lichid și cel gazos al culturii. În legătură cu aspectele relevate s-a stabilit, de exemplu, că la *Datura innoxia* substanțele de creștere și originea țesuturilor utilizate în cultură influențează producția de alcaloizi și formarea biomasei. Astfel, la culturile originare din rădăcini și frunze creșterea este maximă la 6 săptămîni de la înființarea culturii, în timp ce calusurile din flori (corolă gineceu) realizează o creștere maximă la 4 săptămîni. Pe mediu Murashige-Skoog[1], producția de alcaloizi realizată de culturile de țesuta reprezentat abia 1/3 din conținutul de alcaloizi al organului intact (rădăcină, frunză, floare) în timp ce pe medii special preparate producția de alcaloizi a culturilor de țesuturi a depășit conținutul acestora din organele intacte.

Celule cultivate în afara plantei se găsesc într-un mediu foarte diferit de cel natural, fapt care poate duce la modificarea metabolismului secundar. Așa, este posibil ca în cultura *in vitro* celulele să elaboreze produși diferiți de cei biosintetizați de plantă *in vivo*. De exemplu, celulele de tutun în cultură pierd capacitatea de producere a nicotinei, în schimb produc steroizi în cantități considerabile, iar celulele de mentă *in vitro* nu mai sintetizează mentol și mentonă, în locul acestor terpene fiind sintetizate mentofuran și pulegan, care în plantă apar numai sub formă de urme. Aspectele menționate impun studierea elementelor sintetizatoare ale produșilor naturali utili, precum și a modului de acumulare sau excretare. Asemenea studii au și relevat

[1] Pentru a se vedea complexitatea, prezentăm componentele mediului lichid Murashige și Skoog, pus la punct în 1962: (microelemente mg/l) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 370; $CaCl \cdot 2H_2O$ — 440; KNO_3—1900; NH_4NO_3—1650; KH_2PO_4—170; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$—27,85; Na_2EDTA — 37,25; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 22,3; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 8,6; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$—0,025; $AlCl_3$ — 0,025; Ki — 0,83; H_3BO_3 — 6,2; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,025; (componenți organici mg/l) ...aroză —30 — 50 g^{1-1}; glucoză mio-inositol — 100; acid nicotinic — 0,5; piridoxină HCl — 0,5; timină HCl — 0,1; glicină — 2.

faptul că în timp ce celulele prelevate de la anumite specii sînt capabile *in vitro* să sintetizeze substanțe care *in vivo*, în planta întreagă, se găsesc numai în organe și țesuturi specializate, alte celule pot să sintetizeze produși doriți numai în celule sau țesuturi diferențiate. Din această cauză pentru sinteza acestor metaboliți în culturi *in vitro*, după ce din celule se formează calus, în mediu sînt plasate substanțe de creștere inductoare a diferențierii celulare și morfologice (în special auxine și zaharoză).

Substanțele de creștere (auxine, gibereline și citokinine) afectează nu numai ciclul celular și diferențierea celulară, ci și metabolismul secundar, prin stimularea sau inhibarea unor enzime implicate în diverse etape ale lanțului de reacții care asigură producerea și acumularea diverselor substanțe. Ca urmare cunoașterea efectului acestora asupra culturilor *in vitro* este hotărîtoare în producerea metaboliților doriți. Cantitatea acestor produși este corelată strîns cu precursorii introduși în mediul de cultură. Înseamnă că o cerință este cunoașterea tipului și dozelor de precursori necesare pentru a realiza stimularea eficientă a culturii de celule. Lumina, temperatura, aerarea, agitarea și pH-ul culturii sînt factori care prin doze și felul administrării pot stimula sau inhiba procesele de creștere, de diviziune și cele metabolice ale celulelor.

Viitorul producerii drogurilor: cultura de celule și țesuturi

Avantajele menționate ale culturilor de celule și țesuturi fac din aceasta o modalitate ideală pentru producerea agenților medicinali. *In vitro* există posibilități multiple de sporire a producției metaboliților secundari.

Biotransformări. Pe lîngă producerea directă a unor metaboliți secundari, culturile de celule *in vitro* pot fi utilizate și în scopul biotransformării unor substanțe în altele cu întrebuințări diferite. De exemplu, celule de *Datura innoxia* în suspensie glicozilează hidrochinona introdusă în mediu transformînd-o în arbutin (substanță diuretică și antiseptică

urinară), sau convertesc izomeri ai hidroxibenzenului în monoglucozide.

Hidroxilarea glicozidelor cardiace de către suspensiile de celule de *Digitalis lanata* este un alt exemplu de biotransformare (care se poate realiza și în fermentatoare cu enzime imobilizate). Astfel digitoxina și β-metildigitoxina adăugate în mediu sînt biotransformate de rasa 287 T de digitală, prima în purpureoglicozid A (PA) și în compușii de interes medical: digoxin și diacetillanatozid C, iar a doua în β-metildigoxin, din care majoritatea este excretată în mediu.

Suspensii de celule din *Catharanthus roseus* și *Strobilanthes dyerianus*, de 14 zile, au fost aprovizionate cu fenetilamină și compuși înrudiți, după care au fost incubate pînă la o săptămînă. După recoltare și analiza extractelor s-a constatat că numai substratul cu p-metoxifenetilamină produce metaboliți; acest substrat este demetilat de celulele primei specii și glicozilat de celulele celei de a doua specii.

Adăugarea la cultura de calus de *Trypterigium wilfordii* a unor precursori cum ar fi: acidul piruvic, acidul malic -L, acetatul de potasiu și acid lacton-mevalonic au stimulat creșterea țesutului determinînd sinteza unor agenți antineoplastici (anticancerigeni) care erau similari tripdiolidului (Td) și triptolidului (Tl) produși de planta întreagă. Dintre precursori, mai ales acidul piruvic și acetatul de sodiu a stimulat creșterea efectivă a agenților citotoxici.

Producerea alcaloizilor. Cercetări intense au fost efectuate asupra capacității de producere a alcaloizilor de către *Catharanthus roseus*. Extractul acestei specii vegetale conține în concentrații foarte mici alcaloizi bisindolici antitumorali (de exemplu, vinblastina și vincristina). Pentru sporirea producției W. Kohl și alții (1980), în R.F.G., au organizat culturi de celule și țesuturi. Au fost folosite diverse linii celulare, dar majoritatea realizau cantități slabe de alcaloizi. Aplicarea selecției și cultura diverselor linii în bioreactori a permis ca din 720 g de celule liofilizate să se obțină 15 g dintr-un amestec din mai mult de 40 alcaloizi diferiți, care au fost separați prin tehnici cromatografice. Principalii componenți au fost ajmalicina (80%) și vindolinina (10%), iar componenți minori au fost serpentina, un izomer al vindolininei, vindolinina N-oxid și alții. Tot în extractul de *C. roseus*, echipa condusă de W.G.W. Kurz (1980), din Canada, au cercetat indol-alcaloizii. Știind că producerea alcaloizilor este rezultatul influențelor condițiilor de mediu și al genotipului, în bioreactori, în suspensie, au fost cultivate cîteva sute de serii de celule. Analizele au relevat că în biomasa celulară uscată concentrația totală a alcaloizilor a fost cuprinsă între 0,1—1,5%. Analiza componenților a relevat o diversitate foarte mare a tipului de alcaloizi, într-o gamă care cuprinde patru grupe botanice (Corinantha, Strychnos, Iboga și Aspidosperma) și care apar între a 3-a și a 5-a săptămînă a culturii. S-a constatat că o linie produce catharanthină, izomeri de valesiacotamină, ajmalicină, hörhammerinină, hörhammericină, vindolinină, 19-epivindolinină și strictosidină, iar altă linie produce ajmalicină, valesiacotamină, hörhammericină, hörhammerinină, vindolinină, 19-epivindolinină, 19-acetoxi-11-methoxitabersonină, 19-acetoxi-11-hidroxitabersonină, yohimbină, izositsirikină ș.a.

În culturile de suspensie de *Papaver somniferum* toate celulele au capacitatea de a produce morfine. La această concluzie au ajuns cercetătorii englezi P. Morris și M. W.Fowler (1980), care au utilizat diverse medii. Pe unul dintre medii, prin substituirea 2,4 D cu 1 mg/l NAA, s-a obținut o creștere însemnată a celulelor însă cu scăderea biosintezei alcaloizilor. Speciile *Coptis japonica* și *Thalictrum thumbergii* produc în culturi de celule protoberberină și aporfină. Studiul culturilor de celule prelevate de la specia secundă a arătat că acestea produc berberină, palmatină și alți alcaloizi. Dintre aceștia în cultura *in vitro* berberina reprezintă 0,67% față de 0,0019% în planta întreagă.

Sinteza steroizilor și carotenoizilor. Acești metaboliți secundari, ca și terpenele au la bază acidul mevalonic. Un conținut ridicat de compuși steroidici îl are specia *Solanum laciniatum*, iar la carotenoizi rădăcinile de morcov, *Daucus carota*.

Producerea compușilor steroidici de culuri de țesut prelevat din frunze, lăstari și rădăcini de *S. laciniatum* a fost examinată de E. Munteanu și colaboratorii (1981) de la Institutul Agronomic din Cluj-Napoca. Analiza a fost realizată asupra unor subculturi de calus pe așa-numitul mediu Murashige-Skoog suplimentat cu substanțe de creștere, aminoacizi ș.a. Analiza extractelor a relevat producerea *in vitro*

a steroizilor: β-sitosterol, stigmasterol, colesterol, camfesterol, ca și lanosterol, precum și spogenine. *S. laciniatum* biosintetizează și pigmenți carotenoidici: β-carotină (cantități mari în frunze și rădăcini), criptoxantină (în lăstari), zeaxantină, luteină (cantități foarte mari în lăstari).

Carotenoizii au un rol metabolic important pentru om și animale (în celula animală, carotenii reprezintă provitamina A). Conținutul de pigmenți asimilatori și proteine în culturi de țesut a fost analizată și de un colectiv condus de C. Deliu (1981), de la Centrul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca. Au fost folosite explante de rădăcini, din zona țesutului liberian, plasate pe un mediu de cultură adecvat (lichid și solid). Rădăcinile de morcov originare conțineau 107,5 Mg/g de țesut proaspăt, respectiv 10,75 mg la 100 g țesut. Pe mediu nutritiv alcătuit din suport de burete țesutul calusal a acumulat un conținut maxim de carotenoizi (dar de zece ori mai mic comparativ cu conținutul rădăcinii originale). Rezultatele, probabil, vor putea fi radical schimbate prin perfecționarea mediilor de cultură și a condițiilor de iluminat.

Perspective...

Utilizarea unor organisme și tehnologii noi, a marilor descoperiri științifice, în primul rînd a culturilor *in vitro* de celule vegetale realizate în fermentatoare, asemenea microorganismelor, va putea complementa agricultura convențională nu numai cu produse naturale utile, ci mai ales cu cantități însemnate de produse pentru care se utilizează suprafețe de teren infime, cu cheltuieli reduse. În plus, culturile de celule pot realiza sortimente de produse greu de realizat pe cîmp. Aceste trăsături, împreună cu posibilitatea controlării perfecte a condițiilor, fac din cultura celulelor vegetale în fermentatoare o „industrie" care va triumfa în viitor. Sesizarea acestui marș spre progres a determinat firme și societăți economice și bancare occidentale, în primul rînd din R.F.G. și Japonia, să studieze diferite procedee care vor permite exploatarea biotehnologiilor de culturi de celule vegetale în fermentatoare și apoi să treacă la obținerea pe

scară industrială a produselor naturale sintetizate sau secretate de celulele vegetale cultivate. Așa cum am arătat, în anumite condiții favorabile, celulele cultivate *in vitro* sînt capabile să sintetizeze diverși metaboliți produși și de către plante întregi, sau chiar alți metaboliți prin biotransformarea unor precursori sau unor substanțe-substrat introduse în mediu. Se pot obține astfel substanțe de interes alimentar medical sau industrial. Alcaloizii, steroizii, substanțele antibiotice și anticancerigene, mirodeniile și condimentele, odoranții și cosmeticile, acizii organici și aminoacizii neproteici etc., precum și metaboliții primari pot fi extrași din biomasa realizată în suspensiile de celule sau din mediul de cultură în care au fost excretate. Totodată, celulele vegetale au capacitatea de a realiza unele reacții enzimatice, deosebit de dificil sau imposibil de realizat pe cale chimică.

Acestea sînt perspectivele „agriculturii neconvenționale". Importanța deosebită a noului tip de producție, cu mari potențe de extindere și diversificare în viitor, iese mai pregnant în evidență dacă se are în vedere faptul că pentru „recolte" bogate, foarte valoroase calitativ, ea solicită în mare măsură terenuri neagricole sau mici suprafețe din cele destinate culturii convenționale a plantelor. Această trăsătură a „agriculturii neconvenționale" își dezvăluie și mai mult însemnătatea dacă se ține seama că în timp ce în 1975 (la o populație de 4,41 miliarde) exista în lume în medie 0,4 ha teren arabil la o persoană, în anul 2000 (la circa 6,5 miliarde) această suprafață nu va depăși 0,25 ha. Și să nu uităm, totuși, penuria de alimente.

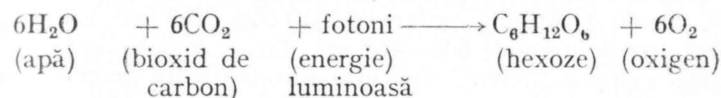
VIII
BIOCONVERSIUNE, AGRIENERGIE, CELULOCHIMIE ȘI... GENETICĂ

Criza energetică, declanșată în 1973—1974, a fost cauzată de creșterea prețului petrolului (prima scumpire a avut loc în ianuarie 1974). Criza a redus sau a frînat ritmurile de creștere economică, în special al unor industriali, unele rămînînd subutilizate, a deteriorat viața lumii în ansamblul ei, practic, în toate țările.

Noua situație a determinat inițierea unor cercetări în vederea lărgirii surselor și rezervelor energetice, pentru dezvoltarea unor tehnologii menite să exploateze competitiv noi forme de energie și alte materii prime decît cele fosile. Se acordă atenție mai ales unor energii neconvenționale: hidraulică, solară, eoliană, a valurilor, utilizarea hidrogenului, precum și a biomasei și folosirea deșeurilor urbane și menajere. Formele noi adiționale, de energie pot aduce un aport însemnat în bilanțul energetic și economic.

Deci, încă o dată nevoia a învățat omul să se adapteze unor condiții deosebite și să găsească soluții noi sau de înlocuire pentru continuarea progresului. În doar cîțiva ani limbajul s-a îmbogățit prin reactivarea sau crearea de noi termeni sau noțiuni: „biotransformare“ sau „bioconversie“, „biomasă energetică“, „agrienergie“, „energie verde“ sau „petrol verde“, „petrol accelerat“ „biotehnologie“, „plante energetice“, „plante petrolifere“, „plante alcooligene“ ș.a. Sînt demonstrate, atît capacitatea inventivă, cît și căutările neîncetate ale omului pentru perfecționarea vieții. Un rol de frunte în această importantă acțiune revine cercetărilor de genetică menite să ridice capacitatea de biosinteză și de stocare a energiei solare de către plante.

PLANTELE ȘI STOCAREA ENERGIEI SOLARE


$6H_2O$ (apă) + $6CO_2$ (bioxid de carbon) + fotoni (energie) luminoasă ⟶ $C_6H_{12}O_6$ (hexoze) + $6O_2$ (oxigen)

Planta = un combinat, frunza =o uzină, celula = o secție, cloroplastul = un reactor, pigmentul verde (clorofila)= un captator de fotoni. Reacția? Un fenomen unic de producție din natură, *fotosinteza*, în care, din substanțe minerale, plantele realizează substanțe organice și oxigen. Schematic, procesul are loc astfel: în cloroplast, într-o primă fază, grație fotonilor captați de clorofilă, molecula de apă este disociată ($2H_2O \rightarrow 4H^+ + O_2 + 4^e$), eliberînd protoni — H^+ și electroni — e^-. Altă parte din cuantele de lumină absorbite de clorofilă este transformată în energie chimică, în procesele de fosforilare a adenozindifosfatului — ADP ($ADP + P_1 \xrightarrow{\text{fotoni}} ATP + H_2O$). În faza următoare, are loc reducerea bioxidului de carbon ($4H^+ + 4e^- + CO_2 \rightarrow (CHOH) + H_2O$) în hexoze (glucide cu 6C). Aceste, reacții însoțite de degajare de oxigen, sînt reprezentate în formula fotosintezei.

Deci, în frunzele verzi, asemuite unor uzine, dar deosebit de curate și silențioase, plecînd de la două materii prime: apă și bioxid de carbon, plus energie luminoasă, are loc fotosinteza sau conversia energiei solare sub formă de energie chimică. Fotosinteza este singurul fenomen prin care Terra fixează sau stochează energia venită de la soare.

Plantele verzi fotoautotrofe (plantele superioare și algele), în procesul fotosintezei, pornind de la hexoze, prin implicarea unor săruri minerale cu azot și sulf, sintetizează acizi organici și aminoacizi, care stau la baza formării proteinelor, lipidelor etc. și în ultimă instanță a structurilor, organelor și volumelor individului adult. Totalitatea substanței organice acumulată în organismul vegetal, sub influența condițiilor de temperatură, umiditate și nutriție minerală, reprezintă *biomasa* sau *recolta biologică* (dată în substanță uscată — s.u.; *recolta agricolă* indică doar biomasa în s.u. acumulată în organele care fac obiectul culturii diferitelor specii vegetale).

Într-un mediu cu o temperatură în jur de 30°C, 3% CO_2 (în aer 0,03% CO_2), 70—85% apă, în prezența macro și micro-elementelor necesare (N, P, K, S, Mg și Fe, Mn, Cu, Mo, Bo, Zn etc.), lumină puternică (30 000—100 000 lucși), la o lungime de undă de 600—685 nm, fotosinteza se desfășoară intens avînd o eficiență ridicată. Randamentul de conversie al energiei solare este maxim, la nivelul de 5—6%. Pentru plantele din cultură captarea și stocarea chimică a energiei solare incidente, la scara unui an, randamentul nu depășește 1% (între 0,1 la 1%).

La speciile din cultură intensitatea fotosintezei la unitatea de suprafață de teren are o amplitudine de variație destul de mare fiind cuprinsă între 5—10 g/m² suprafață foliară/zi biomasă. Trebuie reținut că la un m² teren, suprafața foliară poate fi, de exemplu, la grîu, de 3—6 ori mai mare. (Prin respirație se consumă aproximativ 25% din substanțele produse în fotosinteză).

În zona paralelei 45, deci și în România, în condiții normale, intensitatea fotosintezei corespunde teoretic, în absența stresului hidric, unei biomase, în substanță uscată, de 20—25 t/ha sezon. (În zona ecuatorială biomasa se poate dubla).

Obiective genetice

Printre obiectivele geneticii un loc prioritar îl ocupă inducerea unor schimbări favorabile în activitatea cloroplastelor în direcția ridicării capacității de absorbție și de fixare a radiațiilor luminoase în substanțe organice. Astfel, prin ameliorarea randamentului de conversie a energiei solare se determină o creștere a intensității fotosintezei (v. subcap.: „Genotipuri cu randamente energetice și economice optimizate"...).

În ultimele decenii la diverse specii vegetale din cultură: grîu, porumb, sfeclă de zahăr, castravete etc. au fost obținute soiuri și hibrizi, care în condițiile controlului factorilor hidrici și de nutriție, manifestă capacități biosintetice impresionante. De exemplu, la porumb[1] în cîmpurile C.S.I.O.S.,

[1] M.A.I.A., *Lista oficială a soiurilor și hibrizilor de plante agricole pentru cultură în R.S.R.*, 1979.

hibridul simplu semitimpuriu HS 218, în 136 zile perioadă de vegetație, a realizat o producție de boabe între 41—115q/ha neirigat și între 86—127q/ha irigat. Printre altele introducerea în cultură a hibrizilor de porumb a făcut ca în țara noastră, începînd din 1965 și pînă în 1979, producția medie la hectar să crească continuu de la 17,8 q/ha la 37,2q /ha. Privită prin prisma randamentului conversiei energiei solare la nivelul bobului înseamnă că în 15 ani aceasta s-a dublat (208%), crescînd anual în medie cu 1,3q/ha.

Soiurile de grîu aflate în prezent în cultură au un potențial de producție ridicat, între 50—80q/ha (producția medie pe țară, între 1975 și 1979 a fost de 25,2 q/ha). La grîu biomasa este alcătuită din rădăcini 10—15%, tulpini 34—42%, frunze 15—18% și boabe 30—37%. Înseamnă că producția de boabe reprezintă, practic, în cazul acestei specii, doar o treime din biomasă. Deci, intensitatea fotosintezei la o producție de boabe de 4 000 kg/ha este de 8g/m² suprafață de teren/zi (la 150 zile).

Este binecunoscut că biomasa vegetală este destinată alimentației. Prima funcție a agriculturii a fost, este și va fi, de a hrăni pe om.

Pentru menținerea și progresul ei societatea umană va trebui să producă și să consume cantități tot mai mari de energie. Dar cum tehnologiile de producere și utilizare a unor energii cum este cea nucleară, solară, geotermală ș.a. vor putea fi finalizate doar spre anul '90 s-a pus problema găsirii unor surse noi de energie, mai rapid exploatabile. Așa s-a ajuns să se considere că utilizarea unei părți din biomasă ca sursă de energie, sub formă de combustibili lichizi sau solizi, va constitui o soluție salutară de înlocuire parțială a petrolului. În general, alături de utilizarea clasică în vederea obținerii căldurii, cercetările au relevat că biomasa vegetală poate fi folosită ca materie primă pentru producerea unor carburanți lichizi, precum și a unor combustibili gazoși sau solizi.

În noile condiții, importanța agriculturii crește puternic, deoarece față de funcțiile primordiale clasice: asigurarea hranei, a îmbrăcăminții, a industriilor alimentară, ușoară și a lemnului cu materii prime, apare o funcție complet nouă: *producerea de biomasă energetică*. Producerea și utilizarea biomasei presupun studii și cercetări științifice ample și

temeinice pentru ca reorientările hotărîte să fie raționale și rezonabile, să contribuie alături de celelalte resurse la independentizarea energetică deplină, dar și la asigurarea abundenței de produse alimentare.

BIOTRANSFORMARE SAU BIOCONVERSIE

45,36 kg lemn + 152 kg apă + 80 g acid sulfuric = 2,56 kg de petrol, într-o oră. După procedeul pus la punct de Lawrence Berkeley Laboratory, din San Francisco, S.U.A., se va putea produce comercial, din așchii și deșeuri ale industriei lemnului, „petrol accelerat", la prețul de 29 dolari barilul. La acest preț petrolul din lemn este practic competitiv petrolului fosil vîndut de OPEC.

Tehnologia fabricării accelerate a petrolului, utilizată de uzina pilot din Albany, statul Oregon (care va putea transforma 2 000 t așchii de lemn/zi), constă în următoarele: transformarea așchiilor în rumeguș, macerarea acestuia în apă și acid sulfuric (apa reprezintă 75 % din greutatea amestecului la un pH=2), încălzirea la 180° C, timp de 45 minute, amestecarea pentru obținerea unei paste omogene, trecerea într-un reactor, în care presiunea și temperatura cresc treptat la 200 atm., respectiv, 360° C; în reactor are loc, în 10 minute, conversia lemnului în petrol. Faza „petrol" conține 92,3% petrol propriu-zis, 7,1% apă și 0,6% corpuri solide. Tehnologia menționată este susceptibilă unor perfecționări mai ales în vederea obținerii unui petrol mai pur.

Bioconversia sau folosirea energiei solare acumulată în biomasă a fost practicată de om din momentul descoperirii focului. Acest mijloc de practicare a conversiei biologice (prin foc; denumită și *bioconversie indirectă*), necesită tehnici extrem de simple, dar randamentul caloric este mic (comparativ cu 1 kg de petrol accelerat care produce 8 740 calorii).

Bioconversie indirectă este și producerea din lemn a petrolului. Aceasta a presupus însemnate fonduri și cercetări îndelungate (în cazul concret cercetările au fost începute în Germania, în 1920, de către F. Fischer și au putut fi încheiate cu succes abia în 1978—1979, în S.U.A., de echipa de cercetători condusă de S. Ergun)[1].

În viitoarele uzine de „petrol accelerat", după tehnologia menționată, poate fi transformată o cantitate însemnată a biomasei lemnoase care poate reprezenta 1/4 din arborii doborîți și transportați în întreprinderile industriei lemnului (din calcule internaționale 26% dintr-un arbore doborît se pierde sub formă de așchii ș.a.).

La masa lemnoasă, reprezentată de așchii și deșeuri rezultate din prelucrarea industrială ca biomasă energetică într-o fază incipientă a producției comerciale a petrolului, pot fi adăugate și sub produsele uscate din activitățile agricole. În cercetările publicate se menționează că subprodusele culturilor agricole însumează în medie 1 500 kg/ha substanță uscată.

Să raportăm această cifră la țara noastră, dar numai la suprafața ocupată de specii agricole ale căror tulpini se elimină greu și îngreunează lucrările solului: soia, cartof de toamnă, floarea-soarelui, cînepă, in de ulei, ricin, mac, tutun, bumbac, viță de vie, sorg, porumb (doar cocenii rezultați din treerarea știuleților în întreprinderile de stat) ș.a. Aceste specii au ocupat, în 1979, peste 2 000 000 hectare. Înseamnă că numai pe această suprafață (după restituirea în sol a unei părți din plante pentru întreținerea fertilității) s-ar obține o producție secundară de biomasă energetică de aproximativ 2 500 000 tone. În condițiile unor dotări corespunzătoare, potențialul petrolier al acestei biomase ar reprezenta (la 50 kg petrol / tonă) biomasă peste 125 000 tone de petrol.

Pentru prelucrarea celor peste 2,5 milioane tone de subproduse uscate agricole în condițiile țării noastre ar fi necesare 6—7 „uzine", care ar trebui construite în mijlocul zonelor de producere a materiei prime. La locul de producere a biomasei uscate sînt necesare depozite și mașini pentru prelucrare primară în vederea reducerii volumului (tocare, presare, uscare etc.) și ușurării manipulării și transportului la fabrici.

---

[1] Harrois-Monin F., *Le petrole accéléré*, în „Science et Vie", Nr. 753, VI, Paris, 1980.

Paiele de grîu (+ secară), orz (+ orzoaică), ovăz, orez, precum și tulpinile de porumb, reprezintă o producție anuală care se ridică (considerînd un raport minim tulpini + frunze: boabe = 1,1) la aproximativ 20 milioane tone (cerealele pentru boabe ocupă anual peste 6,3 milioane hectare). Aceste subproduse ale cerealelor este necesar să rămînă mai departe la dispoziția creșterii animalelor, ca așternut și ca furaje grosiere după prelucrare și înnobilare, precum și ca materie primă pentru fabricile de celuloză. Cu toate acestea, se cuvine menționat că numai paiele de la un hectar cultivat cu grîu conțin o energie echivalentă cu o tonă de petrol.

Cantitatea de „petrol verde" provenită din subprodusele uscate ale agriculturii ar putea fi completată cu deșeuri lemnoase. În acest scop este necesar să se colecteze ramurile copacilor doborîți și răriturile din apropierea pădurilor în exploatare, să se prelucreze primar pentru reducerea volumului și să fie transportate spre întreprinderile industriei lemnului. În preajma acestora vor fi amplasate și noile uzine de „petrol accelerat".

În 1978, în România, producția de cherestea a fost de 4,5 milioane m^3. Înseamnă că arborii doborîți reprezentau între 5—6 milioane m^3 (4,5 x 26% pierderi). Deci subprodusele, practic pierdute, reprezintă 58 500 tEP.

O însemnată cantitate de materie primă ar putea fi furnizată și de specii forestiere repede crescătoare (cu rotație scurtă sau mai mică: 5—20 de ani) și un randament ridicat (8—12 t/ha/an substanță uscată). În acest context, dacă luăm ca exemplu anul 1979, cu 4 706 ha împădurite cu plopi repede crescători, înseamnă că începînd din 1989, prin exploatarea a 1/10 din suprafață, s-ar putea obține anual cel puțin cîte 5 000 tone masă lemnoasă sau 2 500 tEP. La o exploatare rațională și economică, subprodusele de lemn provenite din tăierea pădurilor, a unor crînguri și răchitării, ar putea contribui anual cu o biomasă energetică egală cu cea obținută din subprodusele culturii plantelor — 2,5 milioane tone. Astfel, dacă dotările ar fi asigurate, într-o primă fază, numai dintr-o parte din sub-produsele agriculturii (minus paiele de grîu și tulpinile de porumb) și silviculturii s-ar putea fabrica anual între 300 000 și 500 000 tEP.

Pentru silvicultură apare necesară selecția unor genotipuri cu o intensitate mare a fotosintezei și realizarea unor plantații în terenuri folosite necorespunzător și improprii culturilor agricole. Ca biomasă energetică poate fi utilizat și stuful. (Stuful produce în medie 10 tone/ha substanță uscată. Un kg transformat în pudră produce 5 kWh energie ceea ce înseamnă 50 MWh/hectar).

Potrivit unor calcule estimative, în prezent, biomasa vegetală produsă anual pe teritoriul țării noastre este de aproximativ 100 milioane tone substanță uscată, peste 420 t/km^2 sau peste 4 200 kg/ha teren. În 1985 se preconizează ca biomasa vegetală produsă să ajungă la aproximativ 125 milioane tone substanță uscată (peste 520 t/km^2 sau peste 5 200 kg/ha teren). La nivelul anului 1985 numai 1/3 din această cantitate utilizată ca biomasă energetică ar produce aproximativ 2 milioane tone „petrol verde". (Partea nefolosită din fitomasa totală produsă anual depășește 2/3, care practic se pierde).

Reînnoirea anuală sau periodică a biomasei energetice face din aceasta o materie primă excepțional de valoroasă pentru obținerea „petrolului verde".

Hidrogenul și viitorul lui

Bioconversia directă. Acest tip de conversie biologică constă în utilizarea directă a hidrogenului eliberat de plante în procesul fotosintezei și respirației (prima funcție a acesteia este de a pune în libertate energia chimică).

Hidrogenul poate fi utilizat direct drept combustibil. El are o putere calorică de 120 kg/g, de aproximativ 3 ori mai mare decît cea a petrolului — 42, a lipidelor — 38, și de aproape 8 ori mai mare decît cea a glucidelor — 16, constituentul principal al biomasei uscate.

Bioproducția de hidrogen are loc în trei momente: *primul* la începutul fotosintezei cînd se produce disocierea sau fotoliza apei în care are loc eliberarea de protoni —H^+, un

transfer de electroni —e^-, degajarea de oxigen și sinteza ATP (adenozintrifosfat); *al doilea*, de asemenea, în fotosinteză, care conduce la reducerea CO_2 și producerea de hidrogen grație unei enzime, hidrogenaza: $4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$; *al treilea*, în oxidația biologică, care se realizează prin pierderea de hidrogen, prin dehidrogenare, sub acțiunea unei enzime specifice dehidrogenaza, hidrogenul luat de pe substrat nu se eliberează ci trece pe un acceptor de hidrogen. Așadar, dehidrogenarea reprezintă o pierdere de electroni, deci oxidarea hidrogenului molecular constă: $H_2 - 2e \rightleftharpoons 2H^+$.

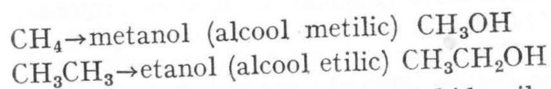
Eliberarea hidrogenului de către plante și eventuala utilizare presupune instalații corespunzătoare și timp.

În prezent producția mondială de hidrogen a ajuns la 200 miliarde m^3 (la 25°C și 1 atm presiune), obținut , în principal, din hidrocarburi, în procesul de rafinare a petrolului și în petrochimie. Hidrogenul, în proporție de peste 50 %, este folosit în sinteza amoniacului (NH_3), utilizat în fabricarea îngrășămintelor cu azot. Restul hidrogenului este folosit în petrochimie, precum și la fabricarea metanolului (alcool metilic), cauciucului sintetic, lubrifianților, margarinei și a numeroși compuși organici. În trecut hidrogenul a fost folosit la umflarea baloanelor, dar explozia dirijabilului „Hindenburg" l-a situat printre gazele periculoase.

În perspectiva producerii sale de către plante și prin hidroliza apei de mare cu electricitate nucleară sau solară, alături de utilizările actuale hidrogenului i se rezervă în viitor noi folosințe importante. Astfel, el va putea fi folosit la lichefierea cărbunelui sau țițeiului șistos care vor putea înlocui petrolul, dar care consumă mari cantități de hidrogen. De asemenea, hidrogenul va putea fi folosit la reducerea minereurilor de fier. Se apreciază că peste 30 de ani hidrogenul va putea reprezenta 10 % din balanța energetică globală, iar peste 70 de ani, cînd va putea fi folosit și în încălzitul industrial și casnic, partea hidrogenului din energetica mondială va putea depăși 30 %.

Va fi aceasta realitatea? Se vor crea genetic plante cu randament ridicat de fotoliză directă a apei?

„FOCUL VERDE"
(ALCOOLII: ÎNLOCUITORI AI BENZINEI?)


$CH_4 \rightarrow$ metanol (alcool metilic) CH_3OH

$CH_3CH_3 \rightarrow$ etanol (alcool etilic) CH_3CH_2OH

Alcoolii... sînt compuși organici hidroxilați, care conțin gruparea hidroxil (-OH) legată de un radical al unei hidrocarburi... și care pot fi folosiți ca un carburant de substituire a ... hidrocarburilor fosile, a benzinei. Astfel, într-o măsură sau alta, producția de alcool poate elibera țările lipsite de resurse proprii de petrol de dependența față de țările exportatoare de asemenea produse.

Doi alcooli și anume metanolul și etanolul pot substitui benzina. Deci, la stațiile Peco, „plinul" rezervorului automobilelor, după unele adaptări, se poate face cu alcooli. Și de ce nu? Iată ce arată analizele în privința proprietăților fizice și mecanice:

Carburant	Densitate	Putere calorică kcal/l	Căldură de vaporizare kcal/l	Cantitate de aer necesară pentru ardere g/g	Indice octanic	Raport de compresie la 1
Benzină[1]	0,750	7 650	60	14,50	97—99	9,0 → 9,5
Metanol	0,796	3 700	220	6,45	110	10,5 → 14
Etanol	0,794	5 050	174	8,95	106	10,5 → 14

Rezultă că alcoolii sînt mai puțin energetici în comparație cu benzina, dar aceasta nu este un dezavantaj, deoarece motorul furnizează aceeași putere. Avantajul alcoolilor constă în cerința înjumătățită de aer pentru ardere. Un motor ce aspiră un litru de aer care se raportează la cantitatea optimă de carburant pentru combustie, va dispune exact de aceeași energie la transformare, adică 0,810 kcal

[1] Augier L., *Carburol: le verdict du carburateur*, în „Science et Vie", Nr. 762, III, Paris, 1981.

pentru un litru de amestec. Înseamnă că dacă se conservă caracteristicile sale mecanice, el va dezvolta exact aceeași putere. Faptul că cifra octanică a alcoolului și raportul de compresie sînt superioare benzinei, va face ca randamentul să crească sensibil. În plus, alcoolul arde mai repede și cum nu va fi necesar să fie injectat în exces ca benzina, se prevede că se poate apropia de proporții optime de îmbogățire ale amestecului cu alcool. În consecință, același motor, bine adaptat și reglat pentru alcool, va putea dezvolta o putere superioară cu 20 % comparativ cu benzina, dar la un consum cu 60—80 % mai mare.

Rămîn însă multe probleme de rezolvat pînă la realizarea posibilității utilizării de către automobile a alcoolului pur. Motorul cu alcool pur nu pornește la o temperatură a mediului sub —12°C, alcoolul este coroziv pentru unele metale și materiale plastice, este miscibil cu apa dar nu cu benzina ș.a.

În prezent, fără schimbări constructive la motorul cu ardere internă (sînt înlocuite doar piesele supuse corodării de către alcool) se obțin bune performanțe prin înlocuirea a 10 % din benzina super cu alcooli numiți carburoli (gazoholi ș.a.). Deocamdată carburantul este reprezentat doar de etanol (10 % etanol + 90 benzină super; Adăugarea în amestecul benzină + alcooli a unui solvent numit „compatibilizant" cum este butanolul, determină inhibarea demixării). Carburolul este accesibil utilizării în automobile în țări mari producătoare de trestie de zahăr (Brazilia) și porumb (S.U.A.).

Avantajele utilizării carburolului sînt mari. *În primul rînd*, se reduce consumul de către automobile a unei însemnate cantități de benzină super (10 %). Aceasta asigură o reducere a dictatului exportatorilor de petrol. *În al doilea rînd*, indicele octanic ridicat al carburolilor face inutilă introducerea în benzină a detonantului clasic, tetraetilul de plumb $Pb(C_2H_5)4$ foarte toxic și foarte poluant. (Metanolul elimină, de asemenea, necesitatea adăugirii la benzină a tetraetilului de plumb, în schimb este toxic.) Se elimină astfel o sursă importantă de poluare care duce la o diminuare, în orașe și pe șosele, a miasmelor asfixiante reprezentate de gazele de eșapament.

În motoare diesel amestecul poate conține pînă la 80 % alcool etilic (sau alcool metilic, care este mai ieftin pentru că se

extrage din lemn). Motorina este necesară pentru pornire și pentru ungerea cilindrilor.

Cercetări recente (1981) au descoperit că există alternativă la utilizarea alcoolului. Astfel, condensarea unei molecule de metanol și a uneia de isobuten, determină apariția metil-terciobutil-eter (MTBE), un eter perfect miscibil cu hidrocarburile, insensibil la apă, perfect indicat pentru folosirea drept „carburol". Acest produs este folosit deja în S.U.A., Italia și R.F. Germania. Singurul inconvenient constă în aceea că isobutenul are origine petrolieră. Altă cale ar fi folosirea amestecului butanol-acetonă-etanol (MBAE): o hidroliză enzimatică a celulozei prin care se obține un zahăr cu 5 atomi de carbon, care prin fermentare, produce un amestec compus din 60 % butanol (alcool butilic $CH_3.CH_2.CH_2.CH_2OH$), 30 % acetonă ($CH_3.CO.CH_3$) și 10 % etanol ($CH_3.CH_2OH$). Acest amestec se comportă exact ca o hidrocarbură, dar are avantajul asupra MTBE că provine din celuloză, deci dintr-o sursă care se poate reînnoi.

METANOLUL: MATERII PRIME ȘI PROCEDEE DE FABRICAȚIE

Metode clasice termochimice. Metanol s-a fabricat și pînă acum. Aproximativ 80 % din producția mondială se obține prin hidrocracarea gazului metan (se obține un amestec de oxid de carbon și hidrogen din a căror sinteză sau lichefiere catalitică sub presiune rezultă metanolul). Prin acest procedeu, din 0,65 t gaz metan se obține o tonă metanol (în Franța, la prețul de 1 300 F/tona). Se obține curent metanol și din gazeificarea cărbunelui. Dintr-o cantitate de 1,5 t cărbune rezultă o tonă metanol. În funcție de prețul de extragere al cărbunelui, de zăcămînt (bogat și la suprafață sau sărac și în subteran), tona de metanol ajunge la 1 000—2 000 F. Echivalența în energie este 2,1 t metanol, care costă 2 100 F = 1 t benzină super, care costă 1 750 F. Deci, metanolul produs din

gaz nu este departe de a fi competitiv față de benzină. Metanol se poate obține și din petrol greu, rezultat din prelucrarea petrolului din turbă și din alte hidrocarburi.

Gazeificarea lemnului. Un procedeu, în prezent la fel de economic ca și folosirea gazului natural, este gazeificarea lemnului și a deșeurilor lemnoase. Dintr-o 100 kg lemn se produc 50 kg metanol. (După unele date CNEEMA[1], 1979, din oxidul de carbon și hidrogenul obținute din gazeificarea biomasei, urmată de lichefierea catalitică a acestora, se poate ajunge la un randament global cuprins între 70 și 80%, iar după date recente pînă la 90%). Deci în funcție de regiuni, din lemnul recoltat de pe un hectar, pe an: 5—20 t substanță uscată se poate obține 2,5—10 t metanol (produs în Franța la prețul de 1 050 F/1 tEP metanol, față de 1 700 F/t benzină). (Din 100 kg subproduse celulozice agricole se sintetizează doar 37—40 kg metanol.)

Se poate conclude că biomasa lemnoasă este o materie primă deosebit de convenabilă pentru sinteza metanolului mai ales în condiții de penurie petrolieră sau ridicarea în continuare a prețurilor petrolului. În consecință, în lume se acționează în două direcții: în vederea construirii unor uzine pilot care să utilizeze biomasa lemnoasă și subprodusele celulozice agricole pentru fabricarea metanolului și pentru detectarea sau crearea unor genotipuri cît mai potrivite acestui scop.

Metanizarea deșeurilor umede

7 500 de vaci produc într-o zi 20 tone de gunoi de grajd. Prin fermentația anaerobă a acestei cantități de gunoi de grajd se pot obține 4 500 m³ biogaz, din care 60% este gaz metan adică 2 700 m³ (2 700 x 365 zile = 985 500 m³ gaz metan).

La gunoiul de grajd și la dejecțiile rezultate de la combinatele de creștere a taurinelor se adaugă deșeurile industriei agroalimentare și cantități însemnate de nămoluri organice de la combinatele de creștere a porcilor și păsărilor, precum și

[1] „Centre National d'Etudes et d'Experimentation de Machinisme Agricole", Franța, 1980.

uriașele cantități de nămoluri rezultate din procesul de epurare a apelor uzate menajere și orășenești, plus deșeurile organice urbane solide.

Producerea biogazului din gunoi de grajd nu este o noutate. Este doar o renaștere a metodei. În anii '40 și '50, în Franța, Germania și alte țări, unele ferme mai mari erau echipate cu digestoare-gazometre, de tip artizanal, care produceau biogaz. Prețul scăzut al petrolului, după al doilea război mondial și, de asemenea, rărirea și scumpirea mîinii de lucru (instalațiile necesitau numeroase manipulări), au făcut ca biogazul să cadă în desuetudine. În Franța, dintr-o mie de instalații, de producere a biogazului din gunoi, în 1973, mai erau în funcțiune doar vreo 40.

Criza energetică declanșată în 1974 a repus pe tapet metanizarea deșeurilor organice. Dar, chiar dacă criza n-ar fi existat, metoda metanizării deșeurilor trebuia reluată. Folosirea acestei metode este impusă de necesitatea debarasării mediului (nu atît de gunoiul de grajd rezultat din creșterea vitelor care poate fi administrat relativ ușor pe terenurile agricole) mai ales de deșeurile industriei agroalimentare, de nămolurile combinatelor de păsări și porci și de cele rezultate din activități menajere.

Analiza producțiilor actuale de etanol și metanol în țări ca România, Franța ș.a. (cu rezerve mici de hidrocarburi fosile) relevă faptul că acești alcooli de sinteză chimică, produși de industria petrochimică, abia ajung ca materie primă în industria chimică. Ca urmare, la producția actuală nici etanolul industrial și nici metanolul industrial nu pot fi utilizați drept carburoli. În acest context găsirea unei noi materii prime pentru metanol apare ca o necesitate stringentă. Or, exploatarea deșeurilor poate asigura producerea carburolilor.

Creșterea rapidă a populației orășenești face ca în cel mult 20 de ani, cantitatea de gunoaie să se dubleze. Colectarea acestora este obligatorie. În lipsa unor preocupări gospodărești și a unor instalații corespunzătoare, aglomerarea gunoaielor uscate și deversarea dejecțiilor umane, în jurul unităților producătoare și a localităților, în ape curgătoare și lacuri are efecte foarte poluante. Locurile obișnuite de depozitare a gunoaielor urbane și de vidanjare a dejecțiilor

sînt saturate, se extind, fumegă continuu, creînd în jurul așezărilor umane un peisaj dezolant și nociv. De aceea este stringentă construirea de instalații și uzine de transformare energetică a deșeurilor organice urbane, solide și umede, pentru producerea de căldură, dar și pentru recuperarea metalelor prin triajul dejecțiilor. În prezent sînt puține asemenea uzine de transformare. (După studiile CNEEMA, din februarie 1980, în Franța, exista doar o singură instalație de recuperare a materialelor din dejecțiile menajere și relativ puține uzine de producere a căldurii). Deci metanizarea, chiar dacă pe plan economic nu a cucerit încă toate sufragiile, apare alături de beneficiul energetic, ca o necesitate pe plan ecologic, contribuind la ocrotirea mediului ambiant.

Fermentația anaerobă metanică, în mediu favorabil, produce un gaz combustibil — biogazul, relativ bogat în metan (pînă la 60%). Acest tip de fermentație implică trei etape succesive: 1 — *solubilizarea* și *hidroliza* constituenților organici. Pentru biodegradarea fracției lignino-celulozice în proporție de 75% sînt necesare 6 săptămîni, timp în care substanța organică este distrusă în proporție de 50%, iar hemicelulozele, acizii grași volatili și alte substanțe poluante sînt distruse în totalitate; 2 — *acidogeneza* produsă de sușe cunoscute de microorganisme; 3 — *metanogeneza* rezultată din descompunerea de către populații puțin cunoscute de microorganisme a acizilor organici (70%) și reducerea H_2 + CO_2 liberați de acidogeneză (30%).

Din substratele glucidice metanogeneza formează volume aproximativ egale de CH_4 și de CO_2 (CH_4 este într-un volum puțin superior CO_2). Randamentul metanizării deșeurilor agricole este: dintr-un kg substanță uscată rezultă 0,45 m^3 biogaz (0,23 m^3 CH_4); la o hidroliză completă dintr-un kg celuloză rezultă 0,83 m^3 biogaz. Fermentarea anaerobă înlătură necesitatea dezodorizării dejecțiilor (spre deosebire de fermentația aerobă care impune o dezodorizare costisitoare).

Biomasa umedă bogată în celuloză, după o solubilizare prealabilă, poate fi supusă unei fermentații aerobe alcoolice. O asemenea utilizare, de exemplu, a unor deșeuri ale industriei agroalimentare, a gunoiului de grajd produs de bovine ș.a. apare ca interesantă și deosebit de economică.

Biogazul poate fi utilizat în numeroase întrebuințări, grupate în trei categorii: 1 — *căldură*, prin conducerea gazu-

lui sărac și arderea lui într-un cămin. Temperatura realizată este superioară celei produsă de arderea lemnului; 2 — *energie mecanică*, gazul sărac este potrivit pentru combustie în motoare. Pentru acest scop el poate fi îmbuteliat. Randamentul final al filierei gazogen-motor poate fi mai mare cu 25% comparativ cu filiera combustie-căldură-turbină de vapori; 3 — *chimie*, gazul din produsele vegetale are o reactivitate chimică mărită comparativ cu gazul metan și este economic pentru sinteza metanolului și amoniacului.

În privința utilizărilor se menționează că în India biogazul este folosit în funcționarea tractoarelor. În R.P. Chineză se estimează la 4 milioane numărul digestoarelor instalate. În Suedia, unele ferme sînt încălzite cu biogaz provenit din gunoi de grajd. Programe de metanizare, deocamdată în fază de proiect, există în S.U.A., Sri-Lanka, Taivan ș.a.

În S.U.A., Compania CRAP, în Guymon, Oklahoma, metanizează zilnic 200 t de dejecții, de la 75 000 bovine și obține 45 000 m^3 biogaz. Ulterior purificării (rămîn 27 000 m^3 gaz metan) metanul este pompat printr-o conductă de peste 2 000 km în rețeaua companiei de gaz din Chicago. După fermentare, subprodusele minerale și substanțele proteice sînt reciclate în furajarea bovinelor și sub formă de îngrășăminte lichide[1]. La Achères, în Franța, unde sînt tratate apele uzate pariziene, fermentarea anaerobă a nămolurilor asigură producerea unei cantități de gaz egală cu 15 000 tEP/an, utilizat pentru acționarea motoarelor staționare de malaxare.

Cantitățile de biomasă organică umedă sînt foarte mari. De exemplu, în România numai animalele (bovine, porcine, păsări, peste 42 milioane capete) aflate (în 1980) în unități agricole de stat au produs cel puțin 70 milioane tone gunoi și nămoluri organice. La acestea pot fi adăugate însemnatele cantități de nămoluri menajere urbane.

Pentru fermentarea metanică anaerobă, dejecțiile trebuie colectate în bazine de fermentare bine etanșate, încălzite la 35°—40°C. Colectarea unor nămoluri cum sînt cele de la combinatele de creștere a porcilor și păsărilor este posibilă prin pompare. Prin conectarea cu ajutorul conductelor a

---

[1] Kovs P., *L'energie verte*, în „Science et Vie", Hors Serie, Nr. 126, I, Paris, 1979.

cîtorva grajduri se poate asigura o aprovizionare continuă și, ca urmare, un proces de fermentare continuă.

Spre deosebire de combustie sau gazeificare care distruge biomasa uscată nepermițînd recuperarea elementelor fertilizante conținute, transformarea energetică a biomasei umede prin fermentare-metanizare, conservă compușii minerali, în principal azotul și fosforul precum și valoarea humică. Ca urmare, efluenții digestoarelor, care reprezintă un îngrășămînt natural foarte prețios, pot fi amestecați în apa de irigare și distribuiți plantelor cultivate. Acesta este un avantaj însemnat care ridică sensibil valoarea economică a metodei metanizării dejecțiilor organice, umede sau lichide.

În bazinele de fermentare (menținute la 35—40°C), randamentul energetic net este doar de 40—60%, în funcție de tipul fermentoarelor folosite. Producția ajunge la maximum 8—13 kWh (circa 10 000 kcal sau echivalentul unui kg de petrol), pe zi și pentru o UVM (unitate vită mare).

În general, interesul economic al metanizării nu a fost demonstrat clar, în conjunctura și cu tehnicile actuale. Dar se admite că randamentul energetic, datorită continuității aprovizionării și fermentării poate să fie eficient economic, nemaivorbind de efectele curative pentru mediu și fertilizante pentru cultura plantelor.

Preocupări pentru producerea biogazului există și în țara noastră. Se urmărește mai ales utilizarea nămolurilor de la stațiile de epurare a apelor uzate urbane. Astfel, încă din anul 1973, la stația de epurare a apelor reziduale de la Prundu-Pitești, funcționează o instalație de biogaz a cărei producție a înlocuit în cei 8 ani de existență milioane de gaz de sondă. În județul Argeș alte 20 de instalații produc zilnic circa 4 500 m^3 de biogaz.

Prin transformarea nămolurilor menajere, în instalații adecvate, se consideră că orașele mari, cu peste 100 000 locuitori, pot dobîndi, din punct de vedere termic și electric, o autonomie energetică deplină. Sînt în curs cercetări menite să contribuie la sporirea rentabilității acțiunii, prin perfecționarea gazometrelor, bazinelor de fermentare, a instalațiilor de purificare a biogazului, a unor motoare adaptate utilizării biogazului ș.a.

Instalația pilot construită la combinatul zootehnic de la Periș, lîngă București, care utilizează dejecțiile produse la o

fermă de 5 000 de porci, a permis întocmirea unui proiect cu o capacitate de 10 ori mai mare. Acest proiect-directiv se extinde deja pe lîngă 6 combinate porcine de cîte 50 000 capete fiecare. Construcția uzinelor de biogaz pe lîngă combinatele și fermele zootehnice de tip industrial ar putea suplini o parte importantă din consumul de energie.

CELULOCHIMIA ȘI PERFECȚIONAREA BIOTEHNOLOGIILOR

... 7 sînt substanțele principale produse din petrol de chimia clasică industrială „petrochimia": metan, etilen, propene, butene, butadien, benzen, toluen, xilen. Dintre acestea etilena (C_2H_4) stă la originea a circa 45% din ansamblul produselor manufacturate (inclusiv a materialelor plastice).

... lemnul: sursă de materie primă pentru o nouă chimie industrială „celulochimia"[1]... deoarece prin conversia specifică a celulozei în glucoză rezultă: metan, etanol, din etanol → etilenă → butadien ș.a. Celulochimia nu recurge la reacții și reactivi chimici. Ea se bazează pe biotehnologii care sînt mai blînde, mai selective și cu randament înalt.

Compușii lignino-celulozici reprezintă o parte importantă a substanței uscate vegetale. Lemnul uscat al pădurilor noastre este alcătuit în medie din 58% celuloză — $(C_6H_{10}O_5)_n$, 18% hemiceluloză și 19% lignină. Acești compuși sînt polimeri complecși, combinați între ei, ceea ce face ca degradarea lor în stare naturală să fie dificilă și lentă. (Macromoleculele acestora sînt formate prin asocierea unui număr mai mult sau mai puțin mare a aceleiași molecule simple).

Utilizarea substanțelor celulozice, în special a lemnului, ca surse de materii prime în chimie, presupune hidrolizarea prealabilă a acestora. Macromoleculele de celuloză sînt scindate în molecule mai mici, care sînt solubilizate și transformate în hexoze (zaharuri cu C_6). Etanolul se poate obține doar din celuloză hidrolizată.

[1] Lattes A., *Des hydrocarbures sans pétrole ni charbon*, în „Science et Vie", Hors Serie, Nr. 133, IV, Paris, 1980.

Hidroliza biomasei, în special a celulozei și hemicelulozelor se poate realiza chimic și enzimatic. În prezent hidroliza celulozei prin procedee chimice, prezintă cel mai mare interes. Metoda a ajuns pînă la stadiul de stații-pilot. În hidroliza enzimatică intervin celulazele care atacă celuloza, enzime secretate de bacterii și ciuperci. Dar acestea (enzimele) atacă doar celuloza pură și nu biomasa lignino-celulozică. Din această cauză hidroliza enzimatică a celulozei trebuie precedată de un pretratament al substanței vegetale.

Faptul că hidroliza enzimatică a celulozei în glucoză are un caracter specific a făcut să-i fie închinate numeroase cercetări. De exemplu, la Universitatea din Connecticut, din S.U.A., a fost realizată o celulază (compusă din endoglucanază, celobiohidrolază și β-glucosidază) care clivează legăturile β-1,4. Primele două enzime produc celobioză, hidrolizată de a treia enzimă în glucoză. În acest fel se realizează o utilizare totală a lemnului.

Prin fermentare din glucoză se obține etanol și apoi etilenă etc. După terminarea fermentațiilor amestecul rămas conține o mare cantitate de microorganisme (aproximativ 100 g la un kg de glucoză), de aceea acest amestec este utilizabil în alimentația umană și furajarea animalelor.

Utilizarea în celulochimie și a altor fermentații poate să conducă la producerea și a altor produse foarte utile. Dintre acestea menționăm:

— *acetona și butanolul,* produse de bacterii din diverse substanțe vegetale (în S.U.A. și Canada, din porumb) sau hidrolizați. În Africa de Sud, după acest procedeu (pus la punct încă în 1914) se produc anual din diferite materiale în jur de 1 800 t butanol și 900 t acetonă;

— *glicerolul,* prin fermentația levurilor sau bacteriilor, sau prin hidrogenoliza soluțiilor de glucoză;

— *butandiol* — 2, 3, pornind de la zaharuri pentozice, C_5, care sînt, în general, greu utilizabile în fermentație. La Universitatea din Auburn, S.U.A., a fost izolată o bacterie care convertește aproape toate zaharurile rezultate din hidroliza hemicelulozei;

— *numeroși acizi organici,* produși prin fermentație cum sînt acizii: citric, lactic, piruvic, acetic, fumaric ș.a.

În 1974, țările occidentale dezvoltate au produs, din melasă și din parafină, 205 000 t de acid citric.

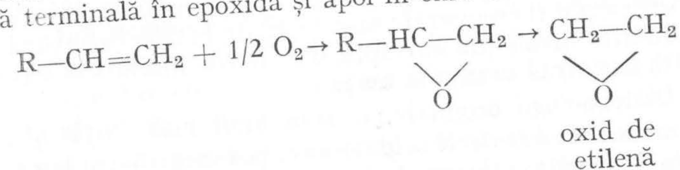
Prin procedee fermentative din lignină se pot obține produși *aromatici*. Laboratorul american Erikson a pus la punct un procedeu de delignificare. În acest laborator, prin iradierea cu raze ultraviolete a speciei *Sporotrichum pulverulentum,* a fost indusă experimental mutanta „white rot fungus". Această mutantă nu are posibilitatea să producă celulaze și deci nu poate hidroliza celuloza, ea poate ataca însă lignina reducînd astfel forțele de legătură dintre fibrele de celuloză.

Prin transformarea parțială a produșilor biomasei vegetale se pot obține, printre altele, și biopolimeri și detergenți.

Biopolimerii, cu masă moleculară ridicată (se pleacă de la zahăr atacat de diferite microorganisme) cum este dextranul, xantanul ș.a.. Xantanul, rezultat din celuloză, cu o greutate moleculară de multe milioane, este produs din glucoză de bacteria *Xanthomonas campestris* și este folosit la recuperarea asistată a petrolului.

Biodetergenții se obțin din zaharoză sau alte zaharuri, din care se pot prepara esteri ai acizilor grași cu proprietăți detergente. Ei sînt produși deja la scară industrială (în 1980, 2 000 t în Franța, 3 000 t în Japonia, 1 000 t în Anglia + S.U.A.), fiind folosiți ca aditivi în alimentație, în cosmetică și farmaceutică.

Cu ajutorul microorganismelor se poate realiza și oxidarea alchenelor. Astfel, *Pseudomonas oleovorans* transformă o olefină terminală în epoxidă și apoi în oxid de etilenă:



$$R{-}CH{=}CH_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow R{-}HC{-}CH_2 \rightarrow CH_2{-}CH_2$$

În S.U.A. se produc 2,2 milioane tone de oxid de etilenă.

Prin biotehnologii diverse se obțin *uleiuri* și *grăsimi,* asemănătoare acelora produse de animale și plante. Acizii grași: oleic, linoleic și palmitic, produși fermentativ sînt asemănători celor sintetizați de plante. Unele specii de microorganisme (*Entomophtora*) produc acizi polinesaturați, iar

altele (*Claviceps*) produc acid ricinoleic. Grăsimile produse de microorganisme (levuri și ciuperci) prezintă chiar mai mult interes decît proteinele. Levurile și ciupercile unicelulare, pe mediu de cultură format din melasă, etanol, glucoză sau celuloză hidrolizată, depozitează însemnate cantități de lipide care pot ajunge să reprezinte 70% din masa totală a celulei.

Prepararea proteinelor pornind de la petrol care constituie substrat pentru unele microorganisme producătoare de proteine a trezit un interes deosebit. A fost obținut un „beefsteak din petrol". Produsul evidenția însă prezența substanțelor aromatice care a limitat dezvoltarea metodei. Există însă posibilități de remediere a inconvenientelor existente și de perfecționare a acestei metode care va putea pune la dispoziția omenirii o cantitate suplimentară de proteine. Se va putea astfel reduce mult deficitul de proteine.

Societatea umană utilizează fermentațiile și la producerea unor vitamine cum sînt: B_{12} (în totalitate), B_2, C și A (în parte). La fel și la producerea antibioticelor. Bacteriile produc chiar și insecticide. Astfel, *Bacillus thuringiensis* produce un insecticid puternic selectiv: este activ împotriva diferitelor lepidoptere și a cîtorva diptere și este inactiv față de om și animalele domestice.

Există microorganisme care includ în corpul lor odată cu compușii organici diverse metale: fier, magneziu, mangan, cobalt, molibden, zinc, cupru. Microorganismele extrag aceste metale din soluții foarte slabe, concentrîndu-le. Prin acest procedeu pot fi recuperate metale aflate în concentrații slabe, în diferite medii (de exemplu, în mediul marin din care ar putea fi extras uraniu și aur).

Biotehnologii originale, oricum mult mai simple și mai puțin costisitoare decît cele tehnice, pot contribui și la extragerea petrolului din zăcămintele sărace, sau secătuite, ori bogate dar cu vîscozitate mare. În acest scop puțurile sînt inseminate cu microorganisme, cu rolul de a degrada produsele petroliere grele și de a se produce biodetergenți. Puțurile pot fi injectate cu aditivi cum sînt biopolimerii hidrosolubili. În acest fel crește mobilitatea țițeiului și este favorizată extracția.

AGRIENERGIE: ÎN LIMITELE RAȚIONALULUI!

În 1978, în lume s-au produs: 441,5 milioane tone grîu 348,5 milioane tone porumb, 91,0 milioane tone zahăr, 273,0 milioane tone cartofi etc., au existat 1,3 miliarde bovine, 732,0 milioane porcine, 1,0 miliarde ovine etc. Au satisfăcut aceste producții ale agriculturii cererile de pîine, de lapte, de carne? După cum se știe prea bine o treime din populația lumii suferă de o foame cronică, iar o altă treime este neîndestulată alimentar.

Tot în anul 1978 s-au extras 2,9 miliarde tone petrol, 3,0 miliarde tone cărbune, s-au produs 9,3 miliarde tEC energie etc. Explorările au stabilit că zăcămintele de petrol și gaz, în cel mai rău caz, vor satisface cererile de hidrocarburi fosile încă 50 — 70 de ani.

Deci! Foamea de alimente este azi! Foamea de petrol cel mai devreme peste 3 generații.

Ce proporții are foamea? Iată o apreciere recentă (referire la anul 1981) a Comitetului F.A.O. însărcinat cu supravegherea aplicării planului de acțiune pentru stabilirea unei securități alimentare mondiale (alcătuit din delegații a 89 țări membre): situația alimentară este deosebit de preocupantă. Un număr de 20 de țări, între care 17 din Africa, suferă de pe urma unor penurii alimentare grave, iar două treimi din cele 54 de țări înregistrate ca avînd un deficit alimentar cronic au cunoscut o diminuare a producției lor agricole pe locuitor în cursul ultimului deceniu.

Cauzele? Se pot desprinde și din „Raportul asupra comerțului și dezvoltării", întocmit de secretariatul UNCTAD (Conferința Națiunilor Unite pentru Comerț și Dezvoltare), discutat la Geneva, în vara anului 1982, de Consiliul Conferinței, alcătuit din delegații a 124 de țări membre, între care și România. De la început s-a recunoscut faptul că discuția a avut loc pe fundalul celei mai grave crize economice și financiare din perioada postbelică. În context, deosebit de critică

apare situația țărilor sărace, unde trăiesc două treimi din omenire. Ele au o datorie externă uriașă: 540 miliarde în scripte, dar peste 800 miliarde de dolari în realitate. Aici s-a ajuns mai ales din pricina scăderii prețurilor la materiile prime exportate de „țările lumii a treia" pe de o parte, și din cauza urcării prețurilor produselor industriale importate de ele din țările dezvoltate, pe de altă parte. (La acestea se adaugă și dobînzile înalte practicate pe piețele internaționale de capitaluri.) Or, deteriorarea situației economice a țărilor în curs de dezvoltare, datorită ponderii lor în lume, poartă germenii destabilizării mondiale.Eliminarea progresivă a obstacolelor comerțului mondial și așezarea acestuia pe baze echitabile și stabile, în folosul tuturor statelor, este singura cale a ieșirii din criză.

Acest postulat al zilelor noastre a fost subliniat și repetat din nou de președintele Nicolae Ceaușescu la marea adunare populară din municipiul Vaslui, din 22 septembrie 1982, cînd a spus: „Ca țară în curs de dezvoltare, România acționează, împreună cu celelalte state în curs de dezvoltare, pentru realizarea unei noi ordini economice internaționale și dezvoltarea mai rapidă a statelor rămase în urmă, pentru realizarea unor relații internaționale echitabile spre a se asigura dezvoltarea economico-socială a fiecărei națiuni, stabilitatea economiei mondiale pe baza progresului fiecărui popor"[1].

În timp ce foamea de alimente se poate adînci în urma sporirii populației și a unor condiții de mediu nefavorabile, dar mai ales din cauza unor acțiuni arbitrare politice și economice, producția de energie poate spori atît prin descoperirea unor noi zăcăminte de hidrocarburi fosile, cît și prin extinderea utilizării unor surse de energie neconvențională (nucleară, hidraulică, solară etc.) sau folosirea biomasei energetice. În acest context, prima funcție a agriculturii: asigurarea cu produse agroalimentare a omenirii *trebuie* să crească în importanță și în pondere, să se ajungă astfel la satisfacerea cererilor globale de alimente. Realizarea acestui deziderat presupune existența nealterată a mediului ambiant, ocrotirea pădurilor, a igienei apelor, a purității aerului și păstrarea fertilității naturale a solului, a humusului din sol.

[1] Ceaușescu N., *Cuvîntare la marea adunare populară din municipiul Vaslui, din 22 septembrie 1982*, Scînteia, Nr. 12467, 23 IX 1982.

Avertisment: oricît de mult se vor extinde în viitor formele neconvenționale de producere a unor substanțe organice, inclusiv alimentare, sursa principală de hrană va rezulta *via sol*, direct (produse vegetale) sau indirect (produse animale). Solul reprezintă un capital inestimabil și neînlocuibil. El este un veritabil laborator natural, sediu al celor mai complexe transformări. Din diverse deșeuri el prezervă și reînnoiește viața, fiind el însuși un „țesut" viu care acoperă pămîntul ca o „piele".

Ca și oxigenul pe care-l respirăm solul este un produs al vieții și al activității vitale. El respiră, asimilează și acumulează rezerve. A început să se nască în urmă cu peste 3 miliarde de ani, s-a dezvoltat lent și evoluează ca un superorganism. (Cum s-a precizat sînt necesare cel puțin 5 secole pentru formarea unui sol arabil). Deci, un sol particular, asemenea unui organism viu, se naște, se dezvoltă, moare și dispare iremediabil. Moartea solului este provocată de om.

Așa cum s-a arătat deja pentru agricultură humusul — partea organică asimilabilă a solului este neprețuit: el are capacități apreciabile de a reține apa, de a realiza schimbul de ioni, el are însușirea de a absorbi metale toxice și de a atenua impactul ploilor acide (care din cauza poluării atmosferei de către industrii devin din ce în ce mai acide). Însă humusul nu se reînnoiește decît grație biomasei: la suprafață datorită deșeurilor, iar în profunzime datorită descompunerii rădăcinilor moarte. Structura sa depinde direct de agregarea de molecule coloidale, de argilă, inserate într-o rețea de molecule organice. Dar, moleculele organice sînt continuu consumate de nevertebrate, deci solul trebuie reîmbogățit mereu cu subproduse ale fotosintezei și ale fermentației microbiene. Au fost necesare milioane de ani pentru a se ajunge la acest echilibru.

Prin lipsirea humusului de biomasă, care-l regenerează și-l întreține, cantitatea de molecule organice scade drastic

și, ca urmare, dispare starea de agregare a argilei. Solul devine astfel pulverulent, condiție care favorizează eroziunea și.... dispariția. Îngrășămintele chimice nu înapoiază solului ceea ce „împrumută" omul. Ele sînt „stimulatori" pentru biosinteză și nu „înlocuitori". Înseamnă că întreținerea ecosistemelor și păstrarea nealterată a însușirilor humusului presupune înapoierea continuă în sol a unei părți din ceea ce acesta a produs (în general 1/5 din biomasa vegetală produsă).

Gradul de fertilitate și de sănătate al solului este în bună măsură influențat de a doua fracție organică, cea neasimilabilă sau greu asimilabilă. În agricultura extensivă, această fracție organică este cantitativ, în general, neînsemnată, reprezentată mai ales de lignină. Procesul biodegradării, realizat de microorganisme, elimină substanțele organice, pe care le aduce la stadiul de molecule solubile asimilabile de către plante, animale și chiar microorganisme sau care sînt transportate de ape curgătoare sau ajung în aer. Într-o agricultură intensivă, chimizată, fracția organică neasimilabilă a solului poate să crească. Această situație apare în cazul folosirii unor substanțe chimice organice, nedegradabile de microorganisme. De exemplu, nu sînt biodegradați unii detergenți și unele pesticide (insecticide clorurate, erbicide etc.). Acestea sînt adsorbite pe argilă sau pe diverse substanțe coloidale nemetabolizabile (în special cele care sînt fixate de grupele halogene, nitrate sau metilate), care rămîn refractare la atacul microorganismelor. Unii detergenți, a căror structură moleculară oferă numeroase ramificații orientate în toate direcțiile, scapă, de asemenea, acțiunii microorganismelor. Acumularea acestor substanțe în sol peste anumite limite îl îmbolnăvește, putîndu-l face impropriu vieții.

Din cele menționate se desprinde faptul că o exploatare frenetică și consumul necontrolat al biomasei în lumea întreagă, ca și prezența în sol, peste un anumit nivel, a unor substanțe chimice organice, folosite pentru protejarea culturilor sau ajunse accidental, pot avea consecințe regionale sau mondiale catastrofale.

Se poate astfel conclude că realizarea biomasei energetice nu este o alternativă a biomasei vegetale destinată alimentației. Nu se va realiza nici în dauna teritoriilor mondiale ocupate de păduri și așa într-un regres alarmant. Ea, biomasa energetică, trebuie să fie constituită dintr-o parte, judicios proporționată, a biomasei vegetale totale. Ridicarea fertilității solurilor și crearea unor condiții optime de creștere a plantelor, mai ales prin cultivarea unor soiuri cu randament fotosintetizant sporit, rezistente la dăunători, și aplicarea unor tehnologii perfecționate și nepoluante, vor contribui la sporirea producțiilor agricole alimentare la unitatea de suprafață.

Asigurarea unei organizări corespunzătoare a agriculturii și aplicarea în cultura plantelor a tehnologiilor adecvate poate determina o însemnată creștere a biomasei totale, inclusiv a recoltelor destinate alimentației prin ocuparea acelorași suprafețe. Pe baza unui exemplu concret, România, țară în curs de dezvoltare, se poate afirma că în aproximativ două decade, producția agricolă se poate dubla. Astfel, dacă analizăm datele medii anuale privind suprafețele și producțiile de cereale (grîu + orz + porumb), leguminoase (mazăre + fasole), floarea-soarelui, sfeclă de zahăr, cartof și legume, în semidecadele 1961—1965 și 1976—1979, rezultă următoarele[1]:

	Media anilor			
	1961—1965	%	1976—1979	%
Suprafața totală arabilă în mii ha.	9 819,5	100	9 788,7	99,6
Suprafața totală în mii ha (ocupată cu cereale, leguminoase, plante tehnice și legume)	8 052,1	100	7 937,3	98,6
Producția totală mii tone (cereale, leguminoase, plante tehnice, legume)	18 501,7	100	34 643,6	187,2

[1] Anuarul Statistic al R.S.R., 1980.

În decursul a 19 ani, la o suprafață totală arabilă și una însămînțată, ușor diminuate (cu plantele menționate care ocupau anual în semidecadele menționate cîte 82% și, respectiv, 81,1% din totalul suprafeței arabile), îmbunătățirea tehnologiilor de cultură și utilizarea unei semințe din soiuri și hibrizi cu potențialități genetice ameliorate a asigurat recoltarea de pe aceleași suprafețe a unor producții medii agricole reprezentînd 187,2% față de media anuală a perioadei 1961—1965.

Aceasta este calea pentru disponibilizarea unor suprafețe arabile care urmează a fi destinate culturii plantelor energetice. Tot pentru culturi energetice pot fi folosite unele suprafețe de teren în prezent necultivate. De asemenea, unele mlaștini, bălți sau terenuri, improprii altor scopuri, pot fi amenajate pentru cultura unor plante acvatice.

Așadar, alimente mai multe, dar și plante energetice prin perfecționarea producției agricole și utilizarea cuceririlor cercetării științifice.

Îndeplinirea obiectivelor fundamentale ale noii revoluții agrare în România: creșterea însemnată a producției vegetale și animale și a productivității muncii, a nivelului tehnic, a eficienței economice și a activității sociale generale din satele noastre va contribui tocmai la realizarea unui surplus de bioresurse. Se vor putea satisface cerințele științific fundamentate ale consumului populației, precum și celelalte nevoi ale economiei naționale, cît și unele cerințe de biomasă energetică. Realizarea producțiilor agricole prevăzute în cincinalul 1981—1985 impune valorificarea mai deplină a întregii suprafețe agricole, folosirea judicioasă a bazei tehnico-materiale de care dispune agricultura, a forței de muncă și a specialiștilor.

Înfăptuirea noii revoluții agrare, dezvoltarea și modernizarea susținută a producției agricole, presupune realizarea unei revoluții și în activitatea de cercetare, de introducere și generalizare a progresului tehnic în întreaga agricultură. În această direcție, alături de cercetările științifice avînd drept obiectiv elaborarea de noi tehnologii pentru creșterea producției vegetale și animale o sarcină centrală a cercetării științifice este obținerea în cel mai scurt timp a unor soiuri și hibrizi cu mare potențial de producție și conținut ridicat de substanțe utile, ca și îmbunătățirea raselor de animale.

CULTURI ENERGETICE

Culturi de plante dirijate doar spre producerea energiei. Un asemenea obiectiv este realizabil și rentabil cînd vor fi puse la punct prin cercetări științifice două cerințe:

— detectarea unor specii și crearea genetică a unor varietăți cu un randament energetic ridicat;

— perfecționarea și asigurarea tehnicilor de recoltare, transport, depozitare și transformare a biomasei energetice.

Alături de deșeurile rezultate din exploatarea pădurilor și din industria lemnului și alimentară, din activitatea menajeră și din creșterea animalelor, a tulpinilor, paielor și a altor subproduse agricole, culturile energetice pot furniza o însemnată cantitate de biocombustibili.

Unele plante pot constitui surse prețioase de *combustibili direct utilizabili*. Astfel, diverse specii pot realiza o bioproducție de *hidrogen* (o serie de alge verzi unicelulare, dar care — hidrogenul — nu poate fi stocat în plante), de *hidrocarburi* și de *uleiuri*.

„PLANTAȚII DE PETROL“. Specii vegetale cum sînt *Euphorbia tiriculli, E. lathyris, E. characias, E. abyssinica,* ș.a., din familia *Euphorbiaceae*, din care fac parte circa 280 de genuri și circa 7 000 de specii, printre care arborele de cauciuc — *Hevea brasiliensis*, ricinul (pentru ulei) — *Ricinus communis*, tapiocul (pentru amidon) — *Manihot esculenta*, sînt înzestrate cu celule (și vase după dezvoltarea pereților celulari) laticifere în a căror vacuole se acumulează latex. Compoziția chimică a latexului, care constituie sucul celular, constă dintr-o emulsie în apă de molecule de hidrocarburi, de poliisoprene.

Cercetările desfășurate de laureatul Premiului Nobel Melvin Calvin (pentru descoperiri în domeniul fotosintezei), profesor la Universitatea din orașul Berkeley, California, au evidențiat faptul că aceste molecule, după izolare, pot fi direct utilizabile în rafinăriile de petrol existente. În acestea, printr-un proces de cracare catalitică utilizat la petrolul brut, se poate obține benzină și o gamă largă de produse chimice (care sînt materii prime cu mult mai scumpe decît benzina).

Pentru chimizare „uzinele verzi“, cum sînt numite speciile de euforbia de M. Calvin, după recoltare și uscare, sînt

puse în contact cu un solvent chimic, pentru dizolvarea tuturor hidrocarburilor. Apoi prin tratarea reziduurilor cu un alt solvent se obțin diverse zaharuri fermentescibile. Reziduul lemnos (tip melasă) rezultat în urma acestui ultim proces ar putea fi utilizat drept combustibil (din care o parte poate servi la recuperarea solvenților prin distilare) sau este folosit ca materie primă celulozo-chimică. Potrivit aprecierilor lui Calvin, prin aplicarea acestor tehnologii, din 1 000 tone de substanță uscată vegetală, ar fi posibilă obținerea a 80 tone de hidrocarburi și a 260 tone zaharuri (care, prin fermentare, produc 100 tone de alcool). Chiar după recuperarea solventului mai rămîn încă 200 tone de reziduuri tip melasă. Totalul de energie obținută în acest mod ar fi de peste 9 000 milioane BTU („British Thermal Unit") din 1 000 tone s.u.

În 1976, s-a estimat că o cultură de *Euphorbia lathyris* sau *E. tiriculli* poate realiza un randament între 3 și 15 barili petrol la hectar, într-un an, la un preț variabil între 3 și 10 dolari barilul.

Date destul de recente (1980[1]), furnizate de echipa profesorului M. Calvin, evidențiază că în plantele de *E. lathyris*, cultivate în California, conținutul maxim în hidrocarburi este atins în luna septembrie. În condiții obișnuite de creștere și fără ameliorare, această specie poate realiza un randament la hectar de 25 barili de hidrocarburi (1 baril — 159 litri). (În Japonia, dintr-o plantație experimentală s-au obținut 40 barili petrol/ha). Tot din aceste cercetări a reieșit că prețul pe un baril de benzină rafinată din latex este de 40 dolari. Deci mai scumpă decît benzina din țiței. Dar hidrocarburile din euforbiacee, fiind compuse în principal din terpene primare (C_{15}), produc prin cracare aceiași compuși ca și petrolul din bitum. Or, petrolul din bitum, pentru calitățile sale, costă 50 de dolari barilul.

Se apreciază că prin îmbunătățirea mediului de cultură și prin selecția unor genotipuri cu randament mai mare la hectar, peste cîțiva ani, un hectar cu euforbia poate produce pînă la 75 barili, la un preț de 20 dolari barilul.

Chiar la prețul de 20 dolari barilul din cultura de euforbia, petrolul obținut astfel este cu 40—50% mai ieftin decît

[1] Dorozynski A., *Comment récolter le «petrol verte»*, în „Science et Vie", Nr. 749, II, Paris, 1980.

petrolul vîndut de OPEC. Avantajul „plantațiilor de petrol" este însă enorm dacă se apreciază că euforbiile se pot cultiva pe soluri deșertice și aride. Astfel, suprafețe întinse din diverse țări ale lumii, situate mai ales în spațiul cuprins între ecuator și paralelele 30—45, nord și sud, pot fi amenajate cu plantații de euforbia. (Aceste suprafețe sînt mai mari în Lumea Nouă, Asia, Australia, Africa și mult mai mici în Europa.)

Se apreciază că alături de speciile de euforbia a căror capacitate petroliferă este cunoscută, în flora lumii există sute de specii bogate în compuși energetici. Urmează ca acestea să fie detectate, studiate, cultivate și supuse unui program de ameliorare în vederea ridicării randamentului producției de hidrocarburi. Pentru țările Europei, în programele de ameliorare, de exemplu, a euforbiilor, un obiectiv de prim ordin trebuie să fie obținerea unor genotipuri adaptate condițiilor climatului temperat. Specia *Euphorbia characias*, care crește spontan în zona mediteraneană, poate prezenta un interes aparte, dat fiind faptul că latexul său poate conține 25% cauciuc. Pentru condițiile României, specia *E. lathyris*, va da, probabil, bune rezultate.

Culturi acvatice petrolifere. Zambila de apă, *Eichhornia crassipes*, probabil cea mai prolifică plantă acvatică în zona tropicală, în condiții climatice și de nutriție optime, poate să producă la un hectar, pe zi, o tonă de substanță uscată, circa 300 tone s.u. la un hectar pe an. Aceasta reprezintă echivalentul energetic a 120 tone petrol.

În zone tropicale (este originară din America tropicală), zambila de apă reprezintă o calamitate. Proliferîndu-se rapid blochează stațiile de pompare, canalele de irigație, împiedică navigația și favorizează propagarea unor maladii caracteristice. În zonele temperate aceste inconveniente sînt reduse simțitor. În schimb, zambila de apă poate realiza creșteri mari pe suprafețe ocupate cu ape inutilizabile. Ea are o capacitate remarcabilă pentru epurarea apelor industriale poluate cu metale periculoase (plumb, cadmiu, nichel sau mercur).

Algele care se dezvoltă prodigios în mediu lichid au capacitatea să producă într-un timp scurt cantități apreciabile de substanță uscată la unitatea de suprafață. Unele dintre speciile de alge se remarcă și prin producții speciale. De exemplu,

alga brună *Botryococcus braunii* sintetizează hidrocarburi asemănătoare petrolului greu. Conținutul în hidrocarburi a lichidului extras din această algă variază de la 25 % la 70 %. Avînd o înmulțire redusă comparativ cu alte specii, această algă este supusă în laborator atît unor cercetări menite să inducă unele mutații genice determinante ale unor creșteri și diviziuni mai rapide, cît și pentru elucidarea mecanismului producerii hidrocarburilor[1].

Suprafețele acvatice, în majoritatea țărilor, sînt mari (pe glob mai mult decît dublul suprafeței uscatului). În aceste condiții colonizarea unor suprafețe cu plante acvatice energetice, care nu manifestă cerințe nutritive și nu concurează suprafața ocupată de plantele alimentare, apare ca o sursă foarte valoroasă de biomasă.

Valoarea culturilor de plante acvatice (inclusiv de alge) este cu atît mai mare cu cît ele sînt susceptibile de a valorifica mediile poluate de efluenții urbani sau agro-industriali. Cercetările au stabilit că depoluarea este realizată cu succes de către alge în lacurile de epurare a apelor, iar de către zambila de apă în bazinele de ape calde și poluate ale unor industrii sau centrale electrogene. Biomasa sintetizată în aceste ape uzate, foarte bogată în apă (peste 95%), reprezintă o sursă însemnată pentru biogaz (metan). Astfel, acvacultura bioenergetică este asociată, cu succes, cu procesul depoluării mediului înconjurător.

Producerea uleiurilor vegetale. Floarea-soarelui (43—53% ulei în substanța uscată din sămînță și 58—68% în miez), soia (17—29%), inul de ulei (42—47%), ricinul (47—58%), rapița colza (37—49%), sămînța de bumbac (21—30%), arahidele (55%) ș.a. sintetizează uleiuri pe care le stochează în sămînță. În general aceste specii, cultivate în zonele cu climă temperată, dau la hectar producții mici de ulei, chiar și atunci cînd sînt cultivate doar pentru producția de ulei. De exemplu în 1979, în România, floarea-soarelui a realizat o producție medie de sămînță la hectar doar de 17,1 q, deci între 735 și 906 kg ulei/ha. Această producție de ulei reprezintă

[1]Mariaux S., *Libérer l'énergie du monde vegetale*, în „Science et Vie", Hors Serie Nr. 133, IV, Paris, 1980.

aproximativ 0,7—0,9 tEP, iar la inul pentru ulei, ricin și rapiță, aproximativ cîte 0,4—0,5 tEP/ha.

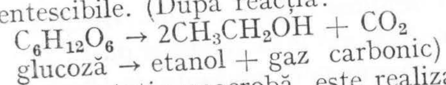
Rezultă că plantele uleioase cultivate în România și în alte țări cu climat temperat (chiar în cazul unor producții duble) nu sînt rentabile ca plante bioenergetice. Cultivarea, în condiții de mediu optime, a unor genotipuri cu capacitate biosintetizantă sporită și un potențial productiv ridicat, poate contribui la adecvarea acestor specii și în zona temperată la producția de carburanți. De exemplu, la floarea-soarelui, hibridul Sorem 80, creat la I.C.C.P.T.-Fundulea, a realizat o producție medie de sămînță de 45,5 q/ha (în cultură irigată, în 1977, la stațiunile Brăila, Valu lui Traian și Lovrin: la ultima stațiune a produs 52,2 q/ha), sau 2,2 t și respectiv 2,6 t ulei la hectar (aproximativ 2,0 tEP, respectiv, 2,3 tEP).

Potrivit unor cercetări efectuate în Africa de Sud uleiul de floarea-soarelui poate fi utilizat drept carburant în motoare diesel. Se apreciază că dacă cultivatorii de porumb însămînțează 1/10 din suprafață cu floarea-soarelui ei vor dispune de întreaga cantitate de carburant necesară pentru tractoarele lor.

Plantele uleioase din zonele cu climat tropical, de exemplu, palmierul de ulei, produc 5—6 t ulei la hectar. Aceasta înseamnă 4,5—5,4 tEP/ha, ceea ce reprezintă o producție rentabilă. În Brazilia, planul Prooleo, bazat pe uleiul de palmier, prevede ca în 1985 să satisfacă o cerere de 21 milioane tone.

Plante alcooligene

Trestia și sfecla de zahăr, porumbul, cartoful, sorgul, grîul, vița de vie ș.a., pot fi numite *alcooligene*. Ele sînt înzestrate cu unele organe (tulpini, rădăcini, boabe, frunze) a căror celule depozitează însemnate cantități de glucide ușor hidrolizabile, care, prin fermentare, sînt transformate în etanol. Amidonul, zaharoza și inulina sînt glucide ușor fermentescibile. (După reacția:



$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + CO_2$

glucoză → etanol + gaz carbonic)

Fermentația anaerobă, este realizată de levurile *Saccharomyces cerevisiae*, care convertesc hexozele sau glucidele de rezervă (glucoză, fructoză etc.), în etanol.

Transformarea glucidelor în etanol se realizează în trei faze: hidroliza glucidelor, fermentația alcoolică și extracția alcoolului.

Randamentul fermentației alcoolice este redus, fiind cuprins doar între 8—15% etanol (din titrul soluțiilor de glucoză; datele medii din tabelul următor indică doar 7,7%).

După cum s-a precizat, levurile transformă doar glucidele de rezervă (fructoza și glucoza din fructe și struguri, zaharoza din sfeclă și trestie de zahăr, amidonul din tuberculii de cartof și boabele de cereale, inulina din tuberculii de topinambur) și glucidele de structură (celuloza tuturor plantelor după o hidroliză prealabilă cu ajutorul unor acizi puternici).

Fermentația este supusă unor factori limitativi: activitatea levurilor este inhibată de substratul în fermentare (glucoza) și de către alcoolul produs. Astfel, la începutul ciclului de fermentare, mustul nu poate conține mai mult de 10—17% zaharuri, iar la sfîrșitul ciclului mai mult de 5—10% alcool (aceasta impune distilarea soluțiilor fermentate pentru concentrarea alcoolului. El este utilizat în rachiuri, parfumerii, produse farmaceutice, solvenți etc.). Efectul inhibitor pare legat de dificultatea transportului etanolului din interiorul celulelor microorganismelor spre exterior. Există speranțe că randamentul fermentației alcoolice va putea fi sensibil sporit prin detectarea unor sușe mutante spontane sau induse de *S. cerevisiae*, rezistente la alcool, cu permeabilitate celulară crescută, cu capacitatea eliminării etanolului în cursul producerii sale, capabile de a fi reciclate, active pe un substrat distribuit fracționat etc.

Sușe din levura *Zymomonas mobilis*, studiate în Australia, realizează un randament de 49 la 50%, față de 47 la 48% realizat de *S. cerevisiae* în urma fermentării glucozei. Or, 2% în plus nu este deloc neglijabil cînd se are în vedere că zahărul, această substanță „nobilă", este responsabil pentru 50—60% din prețul etanolului agricol.

Pentru fermentarea inulinei (formată din D-fructoză), prezentă în topinambur, *Helianthus tuberosus* și dalie, *Dahlia variabilis*, se urmărește găsirea unor mutante de levuri cu o ridicată activitate enzimatică pentru hidroliza și fermentarea concomitentă a substratului. (Extracția alcoolului în distilatoare se poate realiza cu energia furnizată de fermentația metanică a biomasei umede.)

Cele mai productive plante alcooligene sînt topinamburul, sfecla furajeră și sorgul zaharat, urmate de trestia de zahăr, sfecla de zahăr și cartof. Cerealele produc o cantitate de etanol la hectar sensibil mai mică.

Producția brută și producția de alcool la hectar a principalelor zece specii zaharigene sînt prezentate în tabelul următor (date din 1980):

Specia	Producția la hectar, tone	Producția de alcool la hectar, litri
Topinambur	70,0	4 800
Sfeclă furajeră	100,0	4 700
Sorg zaharat	46,0	4 200
Trestie de zahăr	60,0	3 670
Sfeclă de zahăr	45,0	3 400
Cartof	30,0	2 500
Manioc	20,0	2 400
Porumb	6,3	2 300
Sorg de boabe	3,5	1 362
Grîu	2,1	773

În S.U.A., gazoholul, un amestec: 90% benzină + 10% alcool, datorită detaxării, comparativ cu benzina pură, a început să fie folosit pe scară tot mai mare. Astfel, într-un an (1979) consumul de către automobile a crescut de la 2,25 milioane litri, la 32 milioane litri. Principala materie primă a alcoolului din gazohol este porumbul și sorgul.

În Brazilia se urmărește ca, prin folosirea ca materie primă mai ales a trestiei de zahăr și a maniocului, să se realizeze o asemenea cantitate de alcool care la sfîrșitul secolului să asigure autonomia de carburant. În 1978, producția de etanol din trestia de zahăr a fost de 1,5 milioane m³, aproape s-a dublat în 1981 și se va ajunge la aproximativ 20 milioane

m³, în 1985. Se preconizează ca din amestecul actual alco benzină, prin construcția unor noi motoare de automo alcoolul să substituie benzina pînă la 100%. (În Brazilia, 1979, existau 1 000 automobile care utilizau experimen amestecul benzină + alcool; în 1980, numărul unor astfel d automobile a ajuns la 250 000, în 1981 lor li s-au adăug alte 300 000, apoi în 1982 încă 350 000. Astfel, la sfîrșitul a lui 1982, în această țară, peste 900 000 vehicule vor fol drept combustibil un amestec de benzină cu alcool.)

Etanolul va fi folosit și ca materie primă în indust chimică. Deoarece trestia de zahăr ocupă întinse supraf de teren fertil, potrivit pentru cultivarea unor specii alim tare, se preconizează ca în viitor să se extindă cultura mani cului, care are avantajul că produce recolte bune pe teren sărace, recolte ce pot fi ușor stocate pînă la prelucrare. A după cum rezultă din tabel masa producției de manioc l hectar este de 3 ori mai mică comparativ cu aceea de trestie de zahăr, în timp ce producția de alcool este doar de 1,5 ori mai mică. Aceste trăsături fac din manioc, pentru condițiil de climă favorabile cum sînt cele din Brazilia, o excelent plantă alcooligenă. Utilizarea unor soiuri ameliorate de manio cultivate pe terenuri neexploatate pînă în prezent, permit Africii de Sud să producă 500 milioane litri de alcool pe an.

Din analiza tabelului anterior rezultă că, cu toate că economic este rentabilă, în general, transformarea cerealelor în carburanți este un lux mult prea mare și scump, cu atît mai mult că în lume există o penurie de cereale. Europa, Asia, Africa și în ultima decadă și America Latină, cu cele aproape 4 miliarde de locuitori (3,994 miliarde, în 1978) sînt deficitare în producția de cereale. Doar America de Nord (cu o producție, în 1978, de grîu și porumb de circa 200 000 000 tone), Australia și Noua Zeelandă (toate aceste țări cu 0,259 miliarde locuitori) sînt exportatoare de cereale. Situația este dată în tabelul următor (după FAO, Departamentul Agriculturii al S.U.A.; Anuarul Statistic al R.S.R. 1980, și „Science et Vie", VI, 1980):

Continente și țări	Populație 1978	Export = + și import = — în milioane t				
		1934—1938	1948—1952	1960	1970	1978
erica de Nord	242	+ 5	+23	+39	+56	+104
tralia și Noua eelandă	17,4	+ 3	+ 3	+ 6	+12	+14
erica Latină	349	+ 9	+ 1	0	+ 4	0
opa Occidentală	348	—24	—22	—25	—30	—21
ropa de Est și U.R.S.S.	349	+ 5	0	0	0	—27
rica	442	+ 1	0	— 2	— 5	—12
ia	2 461	+ 2	— 6	—17	—37	—53
eania (Est)	4,6					
Total	4 258	+25 —24	+27 —28	+45 —44	+72 —72	+118 —113

Din tabel se desprinde că în 3 decenii S.U.A. și Canada au sporit de 4,5 ori exporturile de cereale (ajungînd la aproximativ 50% din producția de grîu + porumb), iar Asia și-a sporit importurile de aproape 9 ori. În Europa Occidentală importurile s-au menținut practic la același nivel, în timp ce Europa de Est (inclusiv U.R.S.S.) a devenit, după Asia, o mare importatoare. Adăugarea la aceste date a faptului că mulți locuitori din „Lumea a treia" (țări din Asia, Africa și America Latină, care însumează o populație de aproximativ 1,5 miliarde, cu un nivel mediu al produsului național brut pe locuitor în jur de 200 dolari pe an, din care 1/4 nu au un venit personal de 25 dolari pe an) nu au acces zilnic la o felie de pîine, scoate și mai mult în evidență necesitatea cerealelor ca alimente și nu ca sursă pentru obținerea de carburant. Potrivit FAO în 1981, dintre țările cel mai puțin dezvoltate, un număr de 28 state africane aveau nevoie de 6,5 milioane tone cereale în plus, din cauza reducerii producției proprii cu 12% din 1980 (din „Scînteia", 6 iunie, 1981).

În legătură cu această problemă este interesant faptul că un automobil american care rulează într-un an 16 000 km ar trebui aprovizionat cu cerealele recoltate de pe o suprafață de 3,12 hectare (care produc aproximativ 4 300 litri etanol la un randament al fermentației de 37%. Se consumă 1,6 t etanol pentru 1 t echivalent petrol). Or, un cetățean al „lumii a treia" subzistă cu producția cerealieră de pe 0,08 ha, de 39 de ori mai puțin decît ar consuma un automobil mare într-un an. În acest context este evident faptul că nu este rațional și nici moral ca din cereale să se producă benzină și nu pîine.

Speciile zaharigene necerealiere, care cresc în climat temperat, deci și în România, corespund atît ca număr, cît și ca variabilitate genetică obiectivului de a fi cultivate ca materie primă pentru fabricarea etanolului. Printre acestea în afară de vița de vie, primul loc îl ocupă topinamburul. Planta poate realiza producții duble de etanol comparativ cu cartoful. Planta nu este pretențioasă, cultura este complet mecanizată, tuberculii pot fi manipulați și păstrați cu ușurință (mai ușor decît sfecla furajeră, sfecla de zahăr și cartofii). Subprodusele rezultate din cultura topinamburului (tulpini și tăiței) pot fi folosite fie ca îngrășămînt sau în furajarea animalelor, fie pentru producerea metanului.

Topinamburul ca și tulpinile și cocenii de porumb, paiele, ca și materialele lemnoase, după degradarea biologică (hidroliza enzimatică) produc zaharuri cu 5 și 6 atomi de carbon. Ele sînt transformate de bacteriile *Clostridium acetonobutylicum*, care produc fermentația acetonobutilică. După fermentare rezultă o soluție apoasă cu 2% MBAE (amestec de butanol-acetonă-etanol), care după distilare poate fi folosită drept carburol. Avantajul fermentației acetonobutilice constă în faptul că ea transformă toate zaharurile naturale hexozice: amidon, inulină, celuloză etc. și pentozice: hemicelulozele. *C. acetonobutylicum*, transformă cu un randament de 30%. S-a stabilit că unele sușe mutante, aparținînd ciupercii *Trichoderma reesei*, produc enzime care hidrolizează celuloza și hemicelulozele din paie cu un randament de 85%.

Concentrația în soluție a 2% MBAE inhibă fermentarea, fapt care impune distilarea unor soluții foarte diluate. Se speră că unele sușe mutante vor activa și la concentrații mai mari a soluțiilor.

Se poate aprecia că în viitor, dată fiind necesitatea utilizării etanolului agricol în scopuri mai nobile (industrie alimentară, cosmetică, farmaceutică etc.) și a materiilor prime mai ieftine pentru metanol și MBAE, opțiunile se vor îndrepta mai ales spre acești doi alcooli.

În țara noastră, pînă la inițierea și extinderea culturii de topinambur, o parte din producția de cartof și sfeclă de zahăr poate fi folosită ca biomasă energetică. Astfel, dacă la nivelul anului 1990, potrivit estimărilor, producția de tuberculi de cartof va crește la 25,0 t/ha (cu 8,9 t/ha mai mult comparativ cu 1979, cînd s-a cultivat pe 251 500 hectare și s-a obținut o producție totală de 4 031 800 tone), tot pe 250 000 hectare s-ar putea obține, relativ fără eforturi deosebite, un plus de producție de aproximativ 2 200 000 t. Din acest spor de producție 1/2 poate fi folosită ca biomasă energetică. (Menționăm că încă în 1977, trei țări occidentale: Franța, R.F.G. și Marea Britanie, cu suprafețe cultivate cuprinse între 232 000 și 396 000 ha, au obținut în medie între 27,5 și 28,4 t/ha.

Sfecla de zahăr, cultivată în 1979 pe suprafețe de 249 300 hectare a produs 6 277 600 tone, cu o producție medie la ha de 23,6t (în 1977, 24,50 t/ha). Or, producția medie la hectar în 1977, în cinci țări europene: Franța, Polonia, R.F.G., Italia și Spania, cu suprafețe cuprinse între 244 000 și 549 000 ha a fost de 40,0 t/ha (între 30,1 t/ha în Polonia și 47,8 t/ha în R.F.G.; S.U.A., pe aproape 500 000 ha a realizat o producție de 46,2 t/ha. În Europa, producția medie pe 7 562 000 ha cultivate cu sfeclă de zahăr a fost de 32,7 t/ha). Se poate conclude că obiectivul de a realiza, în acest domeniu, 40 t/ha sfeclă de zahăr nu este exagerat. Pe aceeași suprafață (250 000 hectare) s-ar putea realiza o producție totală de circa 10 milioane tone sfeclă de zahăr (cu peste 3,7 milioane tone în plus față de 1979 din care 1/3 poate fi destinată transformării în carburanți).

La nivelul anului 1990, utilizarea ca biomasă energetică doar a unei părți din sporul producției de cartof și sfeclă de zahăr (1,1 + 1,2 = 2,3 milioane tone recoltate de pe 44 000 ha, respectiv de pe 30 000 ha) ar asigura obținerea în plus a peste 200 000 tone etanol —carburant. O suprafață egală — 75 000 ha, cultivată cu topinambur, la potențialul genetic actual al acestei plante, ar produce 340 000 tone etanol.

În general, se poate estima, că în România, prin asigurarea condițiilor tehnico-materiale și organizatorice, biomasa va putea asigura 10 — 15% din consumul de energie.

GENOTIPURI CU RANDAMENTE ENERGETICE ȘI ECONOMICE OPTIMIZATE

Speciile vegetale bioenergetice: sfecla de zahăr, cartoful, topinamburul, sorgul, floarea-soarelui, rapița colza, ca și porumbul, grîul și orzul, dar și plopul, salcia și salcîmul, precum și zambila de apă, euforbiaceele, unele alge, bacterii și levuri și altele, vor fi supuse cercetării în scopul cunoașterii amplitudinii de variație a potențialului genetic privind: 1) randamentul fotosintezei(capacitatea conversiei energiei solare în energie chimică) și posibilitățile de producere și acumulare a biomasei; 2) capacitățile de transformare a produselor inițiale ale fotosintezei în compuși chimici energetici și chimizabili.

Aceste cercetări exploratorii, ale speciilor energetice ca și a microorganismelor transformatoare, creează premisele pentru detectarea și selecția genotipurilor superioare.

Una dintre cele mai spectaculoase descoperiri realizate în urma explorării științifice a lumii vegetale este relevarea existenței, în Brazilia, a unei specii forestiere care produce un suc ce poate fi introdus direct în rezervorul unei mașini și folosit drept combustibil. Exemplul arată că în flora diferitelor regiuni pot exista diverse alte specii ce pot fi considerate posibile surse de hidrocarburi și materii prime.

Genotipurile noi, valoroase, atît la plantele superioare cît și la microorganisme, pot fi utilizate direct pentru producerea biomasei în vederea transformării în energie sau produși chimici. Aceste genotipuri ca și toate acelea care posedă unele caracteristici utile sînt potrivite și ca material inițial în activitatea de inducere a variabilității prin hibridare, mutageneză, sau manipulări genice pentru ameliorarea randamentelor fotosintezei.

Așa cum s-a precizat într-un alt capitol, genotipul și mediul de cultură hotărăsc volumul recoltei și al substanțelor utile produse la hectar. Ca urmare, dacă ne referim la soiurile de sfeclă de zahăr acestea au capacitatea să realizeze în anii viitori, în medie, 40 t/ha, cu 16—17 zahăr cristalizabil. Dar, pentru producția de alcool, puritatea sucului nu este determinantă deoarece este fermentată întreaga cantitate de zaharuri (inclusiv cel necristalizabil care, obișnuit, rămîne în melasă). Din acest motiv pot fi folosiți în cultură hibrizi F_1 triploizi între linii consangvinizate de sfeclă de zahăr și sfeclă furajeră (cu 10—12% zahăr), care ar putea realiza o producție medie de 70 t/ha, cu 14% zahăr. În acest fel la hectar s-ar putea obține aproximativ 10 tone zahăr fermentescibil sau 55 hectolitri etanol (față de 36 hectolitri/ha la sfecla de zahăr). Prin ameliorare unele genotipuri de topinambur ar putea realiza la hectar 70 tone tuberculi din care ar rezulta circa 50 hectolitri alcool.

Intensitatea fotosintezei variază în funcție de capacitatea cu care planta utilizează razele solare. Or, în condiții naturale randamentul conversiei este foarte redus. Ele fac ca energia conținută în moleculele sintetizate de către plante să nu reprezinte decît o neînsemnată parte din energia luminoasă primită de la soare. În condiții de mediu favorabile, trestia de zahăr stochează din energia luminoasă pînă la 2,5%, iar plantele din regiunile cu climat temperat doar, în medie, 0,5%.

Randamentul fotosintezei depinde de cantitatea de lumină solară absorbită de clorofile. Înseamnă că în vederea ameliorării acestei însușiri trebuie să se acționeze atît asupra caracteristicilor morfostructurale și poziției frunzelor, dar mai ales asupra organitelor fotosintezei, cloroplastele. Acestea trebuie studiate atît în contextul frunzei și al celulei, cît și *in vitro*. Fiind sisteme semiautonome, cu capacitatea de a realiza *in vitro* transcripția ARN și sinteza proteinelor proprii,cloroplastele facilitează studiul, caracterizarea și manipularea lor individuală. Prin manipulări genetice, cu utilizarea unor protoplaști receptori, este posibilă atît sporirea numărului cloroplastelor, dar mai ales substituirea cloroplastelor proprii în cazul unei activități reduse cu cloroplaste prelevate de la o plantă donor cu randament fotosintetic ridicat.

Cercetările au evidențiat faptul că ADN-ul circular conținut de un cloroplast este egal cantitativ cu ADN-ul circular conținut de o bacterie, aproximativ 2 × 10^5 perechi de baze azotate, repartizat în 15—30 molecule. Din acest ADN cloroplastic 2—3 % realizează transcripția ARN ribozomal, iar aproximativ 1 % codifică tipurile specifice de ARN de transfer. Alți cistroni cloroplastici codifică ARN mesager pentru proteinele ribozomale proprii, pentru organizarea membranelor cloroplastului, iar unul sau mai mulți cistroni codifică mARN pentru sinteza aparatului fotosintetic funcțional. În vederea ameliorării randamentelor fotosintezei, va fi necesară, probabil, intervenția genetică tocmai asupra acestor gene cloroplastice implicate în sinteza aparatului fotosintetic, inclusiv a cuantozomilor, subunități care conțin aproximativ 200 molecule de clorofile și care au capacitatea de a reacționa fotochimic.

În general, în descrierea mecanismului fotosintezei se precizează că după ce energia radiantă este absorbită de clorofila *a*, o parte este transformată în cloroplaste în energie chimică în procesele de fosforilare a ADP, apoi, în stroma cloroplastelor, pe ribulozo-1, 5-difosfat este fixat CO_2, reacție din care rezultă un compus cu 6 atomi de carbon. În urma combinării acestuia cu apa și a scindării, se formează două molecule de acid fosfogliceric (fiecare cu 3C; 3-fosfoglicerat), care trece în aldehidă 3-fosfoglicerică (3-fosfogliceraldehidă). Deci, primul zahăr stabil, format la nivelul cloroplastelor, are 3 atomi de carbon. Procesul se desfășoară după această schemă (redată sintetic) la marea majoritate a plantelor, în special din regiunile temperate, la unele specii tropicale și la toți arborii. De aceea, asemenea specii fac parte din tipul „C_3". Prin condensarea a două molecule de 3-fosfogliceraldehidă rezultă un zahăr cu șase atomi de carbon, glucozo-6-fosfat, care poate fi polimerizat în amidon. În urma respirației speciilor vegetale „C_3", prin oxidarea hidraților de carbon, rezultă energie, CO_2 și apă. Mecanismul respirației care tinde să reoxideze compușii carbonați formați la nivelul cloroplastelor în anhidră carbonică, este favorizat de o radiație solară intensă, de temperatură ridicată, de oxigen și de o presiune slabă a gazului carbonic din atmosferă.

Un aspect cu totul nou abordat de cercetători este acela al speciilor vegetale de tip „C_4". La acestea primul zahăr stabil,

format în timpul fotosintezei, posedă 4 atomi de carbon, cu un corp cetonic, oxaloacetatul. Se apreciază că realizarea zaharurilor „C_4" este extrem de complexă, comportă schimburi de materiale între celule care includ cloroplaste de tip particular. Se afirmă că în aceste celule gazul carbonic eliberat de respirație este blocat și reluat de mecanismele de sinteză a unor zaharuri cu molecule mult mai mari.

S-a stabilit că speciile „C_4" fixează cu mai multă eficacitate anhidrida carbonică. Specii cum sînt trestia de zahăr, porumbul, sorgul și încă cîteva specii bioenergetice sînt de tipul „C_4". Ele au un randament fosintetic net sporit. Astfel, prin cultivarea unei specii „C_4", alfa, într-o seră de plastic, în atmosferă artificială îmbogățită în CO_2, la o insolație normală, a fost atins un randament fotosintetic de 5%. Aceasta înseamnă aproximativ 5,5 tEP la hectar (ceva mai mult comparativ cu producția palmierului de ulei, 5—6 tone ulei, echivalentă cu 4,5—5,4 tEP). Anual, pe suprafața unui hectar, energia sloară incidentă, calculată în tone echivalent petrol, este în medie 1 100 tEP. Or, din aceasta așa cum s-a menționat, doar 0,5% este folosită și transformată în biomasă. Așa se realizează, în prezent, în țara noastră, o producție totală de aproximativ 100 milioane tone substanță uscată. Sporirea genetică ori agrotehnică sau combinată a randamentului fotosintezei la unitatea de suprafață doar cu 0,1% ar însemna o creștere a producției de biomasă cu 20—25 milioane tone substanță uscată. (Spor apropiat de cel preconizat a se obține în România, în plus față de prezent, în anul 1985).

Estimarea potențialului energetic al speciilor adaptate condițiilor pedoclimatice din țara noastră, cercetarea și elucidarea mecanismelor biosintezei, studierea diferitelor procese privind fotosinteza și conversia în substanțe energetice, inclusiv acțiunea și folosirea enzimelor în biotehnologii, inducerea variației genetice la plantele energetice și la microorganismele implicate în sinteza biomasei sau în fermentații, detectarea sau înmulțirea unor genotipuri cu randamente metabolice perfecționate și multe altele, impun cu necesitate inițierea și dezvoltarea unor programe de cercetări ample, fundamentale și aplicative. Descoperirea faptului că mecanismul biologic de producere a hidrocarburilor este relativ simplu, permit tehnicilor de manipulare genetică să îmbunătățească și mai mult randamentul biosintetic.

Cercetărilor fundamentale privind bioenergia, producer biomasei şi transformării acesteia, le-au fost destinate, 1980, în S.U.A., 57 milioane dolari, în Franţa 114 milioa franci, în Suedia (pentru 1978—1981), 25 milioane dolari, Comunitatea Europeană a finanţat un program de cercetări pentru 1980—1982, de 18 milioane franci etc.

În România, pentru dezvoltarea biomasei energetice şi chimizabile se folosesc, în prezent, cunoştinţele şi mijloacele tehnice-materiale aplicate în producerea biomasei agricole şi silvice.

Cerinţele faţă de energie, consumată în activităţi economice, sociale şi casnice, cresc în fiecare an. Astfel, din 1975, cînd au fost consumaţi 47 157 milioane kWh, s-a ajuns în 1979, la un consum de 60 291 kWh, reprezentînd o creştere de 13 134 milioane kWh sau 127,85 %. Cerinţele actuale şi de perspectivă necesită înlocuirea unei părţi însemnate din energia produsă pe baza carburanţilor fosili cu bioenergie. Cercetările ştiinţifice vor contribui la perfecţionarea activităţii organismelor vegetale utilizate şi la elaborarea biotehnologiilor necesare îmbunătăţirii resurselor de biomasă şi transformării acesteia în energie şi materii chimice.

Cunoştinţele ştiinţifice recente în domeniul geneticii, al biologiei moleculare şi al fotochimiei, constituie premise promiţătoare pentru iniţierea unor cercetări fundamentale menite să asigure ameliorarea substanţială a randamentului de stocare a energiei solare în plante. Se întrevăd chiar perspectivele creării unor specii noi, mai energetice sau susceptibile, de a produce un vector energetic direct utilizabil, cum este, de exemplu, hidrogenul, care se va putea obţine în plante prin fotoliza directă a apei.

IX
STOP! DEŞERTIZĂRII PĂMÎNTULUI

„PREFER SĂ CITESC ZIARELE DIN ANUL TRECUT"

...este declaraţia lui Oscar Wilde (1854—1900) relativ la evocările prezicerilor sau previziunilor viitorologilor. La vremea lui avea oare dreptate acest mare scriitor? Astăzi trebuie să ne fie teamă de ziua de mîine, de viitor? Din nefericire există numeroase motive de temere, de nesiguranţă. Din nenorocire, globul cu viaţa de pe el sînt în pericol.

Pericolul cel mai grav este reprezentat de escalada frenetică a cheltuielilor militare, care au ajuns la peste 650 miliarde de dolari anual. Rachete, tancuri, bombe, submarine, sateliţi, atomi, neutroni, laseri, bacterii, viruşi sînt depozitate mereu, mai multe, în arsenalele războiului. Toate mediile sînt înarmate: atmosfera, apa, pămîntul sînt saturate de arme. Începînd din 1945 pînă la 31 iulie 1982 armele au fost încercate în 142 războaie civile interstatale sau regionale care au implicat circa 90 de ţări, majoritatea din „lumea a treia", şi în care au murit peste 30 milioane oameni.

Dar nivelul de trai? Înarmarea ia bani de la viaţă, iar viaţa se deteriorează, mai ales, cantitatea şi calitatea alimentelor. „Opulenţa" militară se realizează în dauna „porţiei" de mîncare.

Întreţinerea armatelor şi mercenarilor, aprinderea micilor sau marilor conflicte, numeroase manevre armate şi, în final, cheltuielile militare uriaşe, nu numai că devalizează bugetele şi buzunarul contribuabilului reducînd volumul „sacoşei", dar are urmări dezastruoase asupra mediului ambiant. Exploziile bombelor şi rachetelor, craterele, gazele, emisiile radioactive, flăcările, defolianţii, asfixianţii, instalaţiile şi

fabricile militare, încercarea noilor arme, prejudiciază aerul, apa, solul, viețuitoarele din aceste medii, produc răni adînci pămîntului, greu, sau în bună parte ireparabile.

În esență, între activitățile industriale, în special cele de sinteză, agricultura supermecanizată și chimizată, includerea în circuitul vieții a noi tehnologii și a numeroase substanțe chimice nebiodegradabile au efecte secundare dintre cele mai nefaste. Treptat, dar cu o intensitate accelerată, întreg acest ansamblu de activități omenești, economice dar și militare, devastează echilibrul ecosistemelor necesar supraviețuirii speciilor de animale și plante, și poluează mediul de viață al omului.

Rezultă că mediul ambiant, bioresursele și omul sînt grav periclitate. Situația a atras atenția unor oameni politici, cercetători științifici etc., care militează pentru dezvoltarea în opinia publică a conștiinței necesității ca omenirea să-și adapteze practicile și strategiile supraviețuirii, protejării mediului, cît și prosperității pentru toți. Prezentăm unele realizări științifice, cu precădere din domeniul geneticii, și acțiuni social-politice care pot răspunde acestor obiective.

Nu! „masacrului biologic"

Toate acestea sărăcesc resursele genetice, erodînd progresiv zestrea de gene a Terrei, pe care este în curs un adevărat „masacru biologic". Degradarea sau chiar distrugerea echilibrului ecologic, a mediului de viață, datorită acțiunilor iraționale ale oamenilor de-a lungul timpului a răvășit numărul și structura speciilor.

Explorarea și cercetarea florei și faunei Terrei a permis inventarierea a aproximativ 1,5 milioane de specii. S-a estimat însă că pe Terra numărul speciilor animale și vegetale ar putea depăși 3 milioane. Zoologii și entomologii luînd însă în considerație descoperiri de ultimă oră privind extraordinara diversitate a lumii insectelor, în special în pădurile

tropicale, ridică această cifră la aproape 10 milioane: circa 8,5 milioane specii încă neînregistrate. Fi-vor vreodată catalogate aceste specii sau vor muri înainte de a fi cunoscute? Da! Întrebarea este fondată!

Oamenii de știință apreciază că de acum și pînă în anul 2000, numărul speciilor de plante și de animale (mai ales de insecte) ce pot dispare reprezintă o cifră de-a dreptul apocaliptică: către 500 000. Cinci sute de mii de specii dispărute constituie o masă enormă, fără precedent în istoria vieții, cu consecințe negative imprevizibile. De ce existența unui număr atît de mare de specii este pusă sub semnul întrebării în mai puțin de 20 de ani? Deoarece creșterea demografică și mai ales extinderea „civilizației" în regiuni noi, cu precădere în zonele tropicale, în bazinele unora dintre principalele fluvii ale lumii (din America de Sud, Africa, Asia) vor determina defrișarea pădurilor, reducerea și poluarea resurselor de apă, mediile cele mai populate cu specii vegetale și animale (mai ales insecte).

Pe lîngă interesul științific acest capital genetic reprezintă un potențial agricol, chimic și farmaceutic inestimabil. Intensificarea producției agricole și extinderea activităților de ameliorare pe lîngă efectele lor pozitive și utile, elimină de la reproducere nu atît specii, cît mai ales subspecii, rase, soiuri. Dispariția genotipurilor subspecifice restrînge variabilitatea speciilor, sărăcind-o. Așa cum s-a precizat deja, eliminarea din cultură a populațiilor și soiurilor „rustice", în special de cereale, are efecte dăunătoare, din moment ce 4/5 din producția alimentară a lumii provine de la mai puțin de două duzini de specii de plante și animale. S-a arătat că genele originare sau de tip „sălbatic" adevărate „cărămizi de ciment", pot servi la refortificarea protecției plantelor și animalelor utilizate în prezent, în general, cu randament înalt, dar vulnerabile genetic la dăunători și boli.

...Pe stema Moldovei era un zimbru. El „descalecă" din legendă și realitate semnificînd tărie, bărbăție și bogăție. Totodată indică faptul că teritoriul țării noastre era populat cu zimbri. De atunci au trecut circa 700 de ani, timp în care această falnică specie a trecut din realitate în domeniul istoriei, a dispărut și ca și ea au dispărut și alte specii animale și vegetale care făceau faima acestor locuri. Dar în

Europa? Istoricii consemnează prima dispariție a unei specii animale, leul european, în anul 80 e.n. De atunci au murit 120 de specii de mamifere și 150 specii de păsări. Jumătate din acestea au murit după anul 900. Din secolul al XVII-lea și pînă la începutul secolului al XX-lea dispare o specie animală la 10 ani. Se consideră că de acum înainte în Europa va dispărea cîte o specie în fiecare an. Dar în lume? În ultimele trei secole au dispărut peste 400 de specii animale însemnate și sînt grav primejduite alte 1200 de specii (din care 674 specii de vertebrate).

În apele dulci, dispariția speciilor de pești datorită poluării cu azotați, fosfați etc. și tulburării sistemelor biologice naturale au luat proporții catastrofale. Cu riscul de a ne repeta, să exemplificăm cu datele privind lacul Erie, din S.U.A. Primele observații făcute încă în secolul al XVII-lea relevau ape limpezi, bogate în specii valoroase de pești, puțin populate cu alge. După 200 de ani, la începutul secolului al XX-lea, se constată schimbări bruște în viața lacului, în primul rînd dispariția sturionilor, pești gustoși și apreciați: față de 1900 cînd s-au recoltat circa 500 000 kg sturioni, după 10 ani s-au recoltat numai 35 000 kg, iar în 1964 doar circa 2 000 kg. După sturioni au dispărut, în 1920, știuca nordică, apoi, după 1930, scrumbia, urmată în 1940 de știuca Sauger, somonul alb, știuca albastră...

Balena albastră și ciocîrlia, elefantul și dropia, leul de India și cocoșul de pădure, bizonul american și calul de mare, rinocerul și crocodilul, rîsul și jderul, reprezintă doar cîteva din cele 674 de specii de vertebrate amenințate dintre care 75% sînt în pericol major de dispariție.

Cauzele dispariției speciilor de animale trebuie căutate în deteriorarea mediului lor de viață, în dezechilibrarea ecosistemelor, în special, datorită distrugerii vegetației. S-a calculat că fiecare specie vegetală ce dispare poate să atragă după sine dispariția a 30 de specii de mamifere, păsări și insecte. Distrugerea vegetației, voluntară sau mai ales inconștientă, a luat în ultimele decenii proporții înspăimîntătoare.

Utilizarea intensă a solurilor prin chimizare și exploatarea furibundă a resurselor planetei, printre care un loc însemnat îl ocupă pădurile și mineritul de suprafață, determină în viitoarele decenii o reducere drastică a florei datorită micșorării suprafețelor ocupate de păduri, preerii și savane.

Efectele imediate: erodarea eoliană și acvatică, inundația. Astfel, istoria se va repeta, dar la o scară mai mare: în trecut exploatarea nerațională a deșertificat sau degradat teritorii întregi din Mesopotamia, Asia Centrală, Asia Mică, Africa, India etc. Se apreciază că din deșerturile actuale 48 000 000 km² sînt naturale, climatice, iar aproape 10 000 000 km² (9,116 km²) au fost create de om pe terenuri altădată productive, prin deteriorarea din interior a solului în urma unor acțiuni nesăbuite care dezechilibrează ecosistemul sol, prin eliminarea cerințelor vieții. El devine neproductiv, se transformă în pămînt sterp, în deșert. Cauzele deșertificării rezidă în contradicțiile, pe de o parte, între biosferă și tehnologiile aplicate (tehnosferă), iar pe de alta, între acestea și sistemul socio-cultural. În prezent deșerturile ocupă aproximativ 43% din suprafața Terrei, de 4,5 ori mai mult decît totalitatea pămîntului cultivat pentru producția alimentară, care pe planetă ocupă doar aproximativ 13 000 000 km².

Referindu-se la aceste aspecte un raport al experților Programului O.N.U. pentru mediul înconjurător menționează că anual în lume, în urma acțiunilor vîntului, apelor, substanțelor toxice, construcțiilor de localități și de drumuri, precum și a altor obiective se pierd prin eroziune circa 7 milioane hectare de terenuri agricole. În ultimii 200 de ani eroziunea a degradat aproximativ 1/3 din totalul terenurilor agricole. Același raport al experților Națiunilor Unite subliniază că eroziunea solului și pierderea de terenuri agricole ar putea fi oprite numai în cazul în care toate statele s-ar angaja să colaboreze activ în acest domeniu, pe baza unui program global de protecție a solurilor.

În lipsa unui asemenea angajament al tuturor statelor și a unor măsuri eficiente în viitor deșertificarea și degradarea terenurilor va avansa rapid în toate regiunile lumii: vor dispare 20% din speciile cunoscute, se va reduce cu peste 30% suprafața terenurilor cultivate, vor fi nimicite 10% din resursele alimentare. Și toate acestea în mai puțin de două decenii!

Un raport al Consiliului american asupra calității mediului și al Departamentului de Stat, destinat președintelui Statelor Unite, preparat timp de 3 ani de o echipă de specialiști din toate disciplinele științifice, cu colaborarea a zece agenții ale guvernului federal, publicat în iulie 1979, sub

denumire de „Global 2 000", proiectează asupra viitorului lumini neliniștitoare. După ce examinează evoluția populației, a resurselor, a problemelor mediului, autorii precizează că în cazul în care comunitatea internațională nu se organizează urgent pentru redresarea situației: „lumea în anul 2000 va fi și mai poluată, mai instabilă ecologic și încă mai vulnerabilă la tulburări decît cea de azi". Acest raport nu-și propune să sperie, să tulbure pe oameni. Pe baza unor date concrete desprinse din realitățile prezentului, el urmărește să proiecteze lumină asupra viitorului, să atragă atenția că mersul actual este plin de pericole în timp ce un viitor mai bun, mai sigur, înseamnă înțelepciune, rațiune, pe plan intern și internațional. Este necesar un veritabil efort internațional pentru a veni în întîmpinarea problemelor dezvoltării, plecînd de la considerația că propria existență, popoarele, lumea, sînt în cauză.

SĂ APĂRĂM ZESTREA DE GENE A TERREI

Ruina solurilor deja erodate și deșertificarea, extinderea tehnosferei și a așezărilor umane, defrișarea fără milă a pădurilor de-a lungul și de-a latul globului, mai ales în regiunile tropicale ale Asiei, Africii, Americii Latine, în care se află majoritatea bogățiilor biologice, au consecințe dăunătoare asupra vieții și zestrei de gene. La acestea se adaugă efectele negative care pot rezulta din activitatea de ameliorare genetică a plantelor și animalelor. În sine, aceste activități, prin selecția unor genotipuri din ce în ce mai perfecționate, au contribuit, împreună cu îmbunătățirea tehnologiilor, la progresul treptat al producției agricole. Dar ameliorare genetică nu s-a desfășurat dintotdeauna pe baze științifice, căci genetica a fost fondată și dezvoltată chiar în secolul nostru. Mai mult, nici în prezent nu se ține seama cu atenția cuvenită de necesitatea echilibrului ecologic. Acestea au dus și duc la eliminarea subspeciilor populațiilor locale, soiurilor și raselor cu performanțe mai scăzute, care sînt însă mai bine adaptate la clima și la solul unor anumite regiuni și constituie totodată o prețioasă sursă de variabilitate genetică. Trebuie reținut că vechile soiuri de plante și rase de animale sînt creații ale unor vremuri cînd la cultivarea ogorului nu se foloseau mașini, îngrășăminte chimice, pesticide, iar în creșterea animalelor nu existau combinate industrializate cu mii și zeci de mii de capete. Deci, principial, chiar genotipurile create în ultimele două-trei decenii sînt depășite: ele nici nu asimilează cu intensitate maximă și nici nu au o productivitate maximă. În plus, sînt vulnerabile la boli și dăunători, ca și la unii factori climatici, iar tipul plantei și al animalelor este „extensiv", acestea nefiind adaptate și rezistente la îndesirea populației de indivizi pe o unitate de suprafață.

Toate acestea impun ca o stringentă necesitate „reproiectarea", prin manipulări de gene, a vechilor tipuri de plante și animale. Premisa condiționantă a succesului acțiunii de ameliorare îl constituie existența unei ample variabilități genetice, a unor resurse uriașe de gene și plasmagene, de cromozomi și genotipuri. Aceste elemente ale plasmei germinative sînt însă supuse unei erodări continui, din ce în ce mai intense. De aici ideea constituirii unor colecții și bănci de gene.

Multe instituții științifice din lume, începînd din deceniul al treilea al secolului al XX-lea, dar mai ales după ce oamenii de știință H.V. Harlan și M.L. Martini, în 1936, au relevat dispariția graduală a soiurilor primitive de plante în unele „centre genice", au început să exploreze, să evalueze, să conserve și să păstreze germplasma vegetală în colecții, pentru necesități prezente și viitoare. S.U.A. și U.R.S.S. s-au situat în fruntea acestei acțiuni.

Constituirea unei bănci genetice mondiale și întreținerea ei presupune însă cheltuirea unor sume uriașe, de unde nașterea ideii unui mare stoc centralizat, la care să participe și să aibă acces toate țările lumii. Ideea a fost acceptată de prima „ConferințăTehnică asupra Explorării și Introducerii Plantelor", a F.A.O., ținută în 1961, care a hotărît înființarea unei Bănci Internaționale a Resurselor Genetice. Astfel, în 1964, a început cooperarea „International Biological Programme" (I.P.B.) pentru conservarea semințelor. Sediul Băncii Internaționale a Resurselor Genetice este în S.U.A., unde semințele colectate și uscate sînt conservate la frig, iar datele privind genotipurile stocate sînt centralizate cu ajutorul ordinatoarelor. În Europa unele surse genetice au fost depozitate în două bănci, la Bari în Italia și la Braunschweig în

R.F.Germania ca și în cea înființată anterior la Izmir în Turcia. Concomitent s-a lărgit colecția de orez, iar colecțiile existente, cum sînt cele de la Institutul Vavilov din Leningrad și a Departamentului Agriculturii a S.U.A. din Beltsville și din alte părți, au fost substanțial lărgite prin explorări recente.

Fiecare specie cultivată are numeroase forme genetice. De exemplu, colecțiile de porumb din Mexic și America de Sud cuprind circa 40 000 genotipuri sau „intrări", dar experții consideră că acestea reprezintă doar 40% din colecția mondială de 100 000 intrări. La cartof și orez colecțiile din surse principale numără circa 25 000 intrări, care reprezintă doar 50% din colecțiile globale etc. La Fort Collins, Colorado, S.U.A., „Laboratorul Național de Păstrarea Semințelor" cuprinde colecțiile a 200 de specii cultivate. Dintre acestea pentru 30 de specii există colecții mari (100 000 intrări), 50 au colecții de mărimi medii (50 000 intrări), iar 120 au colecții mici (15 000 intrări). Deci, în această bancă există circa 7 300 000 intrări. La Institutul Vavilov din Leningrad, U.R.S.S., colecția mondială de resurse vegetale conține peste 200 000 intrări de semințe, tuberculi, bulbi și plante vii din specii sălbatice, forme primitive, soiuri, hibrizi și linii ameliorate de grîu, secară, orz, porumb, mei, orez, leguminoase, plante industriale, legume, pomi, plante subtropicale, flori și viță de vie. Obișnuit, semințele la—20°C, pot fi păstrate pînă la 30 de ani. După această durată ele se însămînțează, iar noile stocuri de semințe sînt înmagazinate în aceleași condiții.

Genotipurile din colecții se studiază în privința potențialului genetic de producție, al rezistenței la boli și dăunători, la îngheț și secetă. De asemenea, se analizează în privința conținutului și calității proteinelor, a uleiurilor și grăsimilor, a metaboliților secundari etc., urmărindu-se detectarea variantelor valoroase pretabile a fi folosite ca atare, ca sursă de bunuri utile sau ca donori în activitatea de ameliorare. Să nu uităm că pentru detectarea tipului și principiilor activi conținuți de speciile spontane, unii deosebiți de valoroși pentru farmacopeea prezentului și mai ales a viitorului, s-a făcut extrem de puțin. Cu toate acestea în S.U.A., jumătate din medicamentele eliberate pe bază de rețetă conțin compuși de origine vegetală. Din 76 de compuși farmaceutici de bază folosiți în S.U.A., numai 6 sînt produși prin sinteză la un cost

mai scăzut decît atunci cînd sînt extrași din plante. În prezent, în lume sînt consacrate enorme mijloace financiare pentru cercetarea medicală, pornind de la plante și animale puțin cunoscute. În acest scop au fost colecționate și studiate peste 29 000 de specii și forme de plante. Din acestea au fost izolate peste 100 000 extracte, dintre care 3 000 au fost reținute pentru cercetarea și testarea valorii pe care o pot prezenta în medicină, mai ales ca substanțe anticancerigene.

Marea Britanie creează o bancă mondială de semințe de legume, care va proteja în particular speciile neglijate sau fragile, originare din regiuni foarte diverse. Potrivit proiectului această bancă va proteja cel puțin 12 000 forme din specii de legume cultivate și rude sălbatice ale acestora. Fiecare genotip va fi înregistrat de un ordinator, cu datele caracteristice, permițînd astfel geneticienilor și amelioratorilor să repereze rapid și cu certitudine semințele după valoarea lor ereditară, în vederea utilizării ca donori în crearea unor soiuri mai valoroase. De la aceste forme pot fi transferate gene pentru producție, fotosinteză deosebit de eficace, adaptabilitate la irigare, mecanizare, folosințe speciale, inclusiv medicinale etc. Colecția va servi însă în primul rînd ca sursă de gene de rezistență la boli și dăunători știut fiind că plantele legumicole, datorită tehnologiilor de cultură (mai ales în spații acoperite, la temperatură și umiditate mai ridicate, irigare, suprafertilizare etc.) sînt mult mai vulnerabile comparativ, de exemplu, cu cerealele. Utilizarea acestor gene stocate în banca britanică de legume, pentru introducerea rezistenței la boli și insecte, în soiurile cultivate de salată, tomate, castraveți, fasole, ardei etc., va determina nu numai protecția zestrei ereditare ci și protejarea soiurilor actuale de atacul unor agenți patogeni care le dăunează în masă. Aceasta înseamnă atît legume sănătoase, cît și legume curate și mai ieftine, prin eliminarea necesității deselor stropiri cu insectofungicide.

Explorarea, colectarea și prezervarea științifică a resurselor genetice este o acțiune urgentă de cea mai mare importanță. La realizarea acestui obiectiv este dorită antrenarea cercetărilor și a populației din toate părțile lumii într-un timp cît mai scurt. Se estimează că fără aceste acțiuni de stocare a genelor, prin 1985, poate dispare majoritatea resurselor genetice din vechile centre de origine și diversificare a plantelor.

Totodată, pot dispare și majoritatea rudelor sălbatice ale plantelor cultivate prin reducerea habitatelor, în special prin distrugerea ecosistemelor naturale reprezentate de păduri.

Conservarea și depozitarea plantelor

Păstrarea stocurilor genetice de semințe urmărește trei obiective principale. Primul: semințele trebuie să fie păstrate pentru perioade lungi de timp în scopul reducerii costurilor, complicațiilor și riscurilor determinate de cultivarea și înmulțirea plantelor, la intervale frecvente, în vederea înlocuiri stocurilor de semințe care încep să piardă viabilitatea. doilea: evitarea amestecurilor biologice și menținerea atare a genotipurilor, prin reducerea la minimum a alteră genetice. Trei: prezervarea zestrei de gene. Toate aceste obiective pot fi atinse numai prin asigurarea unor condiții optim de păstrare. Astfel, oricare ar fi sistemul de depozitare utiliza principiul urmărit este ca viabilitatea diverselor stocuri genetice să nu coboare sub o valoare relativă ridicată — 85—90%.

În realizarea depozitării, o importanță deosebită o are controlul conținutului în apă al semințelor. O primă metodă utilizată în acest scop constă în uscarea semințelor pînă la un conținut minim dat al umidității după care acestea sînt închise în containere ermetice. Umiditatea relativă din aerul ce înconjoară semințele poate fi controlată și printr-un aparat de aer condiționat. Ambele modalități, păstrarea ermetică sau aerul condiționat, necesită instalații adecvate și costuri însemnate de producție.

Marea majoritate a speciilor, așa-numitele specii „ortodoxe" (cereale, leguminoase, ceapă, morcov, sfeclă etc.), au semințe a căror perioadă de viabilitate poate fi extinsă prin reducerea temperaturii și conținutului în umiditate în timpul depozitării. De exemplu, Japonese National Seed Storage Laboratory for Genetic Resources, usucă semințele pînă la reducerea conținutului umidității la 4—6% după care semințele sînt plasate în cutii obișnuite de conserve care se păstrează în încăperi reci. În S.U.A., în sistemul cu aer condiționat, semințele neuleioase sînt uscate pînă la o umiditate de 9%, după care se păstrează la o temperatură a mediului de 4°C și o umiditate relativă a aerului de 32 procente. În asemenea condiții, pe baza unor calcule computerizate, s-a

desprins că semințele de grîu, orez, bob, mazăre, orz și tomate pot conserva o viabilitate de 90% pe o durată de 12 la 135 de ani. Semințele altor specii, mai ales cele sălbatice, pot să fie păstrate o perioadă și mai lungă.

Semințele unui grup mai mic de specii, așa-numitele specii „recalcitrante", nu pot fi supuse unei uscări prea accentuate, deoarece își pierd viabilitatea. Așa sînt semințele unor specii arboricole: nuc, carpen, alun, castan, stejar, citrice, hevea, cacao, cafea, ș.a. Umiditatea în semințele acestor specii trebuie să rămînă la o valoare relativ ridicată, între 12 și 31% în funcție de specie, altfel viabilitatea tinde să dispară.

Oricare sistem de păstrare a semințelor include un program rutinier regulat de testare a comportării semințelor, a viabilității. Ca urmare, la acestea se analizează capacitatea de germinare sau răsărirea și regenerarea plantei, inclusiv obținerea unor stocuri noi de semințe pentru înlocuirea semințelor învechite. Testarea este determinată de genotip și se efectuează la unele specii la fiecare 5 — 10 ani, iar la altele în sistemele destinate a reține viabilitatea la nivelul de 85 — 90%, la 10 — 100 de ani. Evident că aceste testări, chiar la intervale mari, presupun complicații deosebite și cheltuieli mari, dacă ne gîndim că unele bănci posedă stocuri pentru sute de specii cultivate și că unele specii pot fi reprezentate de peste o sută de mii de genotipuri.

Analizele de rutină ale stocurilor de semințe au ca obiectiv și relevarea stabilității genetice. Pentru aceasta plantele din semințe vechi se compară cu plantele din semințe proaspete. Analiza privește numărul și structura cromozomilor, precum și mutațiile genice. Observații făcute după 1900, asupra plantelor obținute din semințe vechi, au evidențiat că unele plante posedă modificări ale fenotipului care s-au dovedit ereditare. Înseamnă că izolarea semințelor nu este absolută: timpul, temperatura și umiditatea afectează structura genelor. Astfel, au fost detectate mai ales mutații recesive, clorfiliene, care în unele situații precare de păstrare (la reducerea cu 50% a viabilității) au afectat între 1—4% din semințele viabile. O asemenea rată a mutațiilor este deosebit de ridicată fiind similară aceleia indusă prin tratarea semințelor proaspete cu o doză de raze X de 10 000 roentgeni. După 1930 și mai recent s-a constatat că între creșterea ratei mutației genice și proporția aberațiilor cromozomale este un raport direct. De

exemplu, la 50% reducerea viabilității procentul de celule aberante ajunge aproape de 9 (după E.H. Roberts și colab., 1967). Acumularea, o dată cu creșterea duratei de păstrare, a aberațiilor cromozomale., în lipsa diviziunilor celulare, apare ca o latură negativă, care a impus căutarea unor sisteme perfecționate de păstrare a stocurilor de semințe.

Depozitarea la temperaturi scăzute. Prin analogie cu animalele, la care s-a încercat depozitarea la temperaturi scăzute a gameților (după 1964), iar mai recent a embrionilor de șoarece (pînă la 23 săptămîni; 1972), au fost inițiate experiențe și la plante. Scopul: păstrarea semințelor pe termen lung, mai multe secole. De exemplu, semințe din speciile „ortodoxe", cu o umiditate sub 15% (la 5%) au fost plasate la temperaturi de —20°C și apoi la —271°C fără nici un efect nociv. Se consideră că temperatura de —18°C sau mai ridicată (—10°C) este cea mai potrivită pentru depozitarea îndelungată cu deteriorări foarte mici și la prețuri de cost rezonabile. (În azot lichid, între —50°C și —120°C, semințele de grîu cu umiditatea de 15,9% și-au păstrat capacitatea de germinare 100%: tot în azot lichid, dar la —20°C, semințele de grîu au germinat doar în proporție de 38%, iar la —30°C, 55%).

Sistemele de păstrare a tuberculilor și rădăcinilor unor specii cultivate, în special ale celor originare din zone tropicale, sînt mult mai complicate și costisitoare. Printre acestea sînt yamul, cassava, batatul (cartoful dulce), cartoful ș.a. Tuberculii de cartof, care reprezintă structuri tulpinale modificate, fac ca planta în natură să fie perenă, cu un habitus herbaceu. La recoltare tuberculii posedă între 66 și 88% apă în substanța proaspătă; în plus, la o recoltare timpurie ei nu sînt maturi fiziologic. Ca urmare se impune depozitarea tuberculilor, care însă nu poate dura mai mult de cîteva luni (5 — 6 luni), la 5°C și o umiditate relativă a aerului de 90%, la întuneric. Temperatura de 1—2°C în mediul de păstrare poate produce efecte similare înghețării și decolorarea pulpei. Din aceste cauze colecțiile de specii și soiuri de cartof nu se pot păstra sub formă de tuberculi ci numai sub formă de semințe. Dar multe genotipuri de cartof nu produc semințe. Aceasta impune anumite tratamente pentru înflorire, fecundare și producerea bacelor (fructelor), inclusiv polenizarea manuală

În condiții optime colecțiile de semințe se păstrează bine (ca și tomatele), costă puțin și reduce problema bolilor virale.

Păstrarea pe termen lung a materialului lemnos presupune rămînerea mugurilor în stare dormindă, fără o desicare dăunătoare. Pentru aceasta este potrivită temperatura de —2°C la 2°C în funcția de specie. La unele specii temperatura de păstrare trebuie să fie mai scăzută deoarece la ele mugurii se umflă, rădăcinile cresc, iar calusul se dezvoltă chiar la —1°C. Umiditatea relativă ridicată a aerului la o depozitare scurtă este de 96 — 98%.

Pentru prezervare genetică a materialului lemnos la gutui, ramurile au putut fi păstrate la —17°C fără daune. La fel însă ca și la cartof și la acest grup de plante stocurile genetice pot fi păstrate sub formă de semințe (la speciile la care poate fi produsă înflorirea și fructificarea).

La —20°C se pot păstra și diverse stocuri de polen pe durate de cîțiva ani. Pentru perioade scurte polenul poate fi păstrat și la —180 — —190°C, fără reducerea semnificativă a viabilității. Prin reducerea extremă a umidității, înghețarea polenului uscat și plasarea în azot lichid sub vacuum (la—196° C sau aer lichid), s-a constatat că polenul rămîne viabil timp de trei ani. Este sigur faptul că această durată poate fi prelungită mult, pînă la nemurirea polenului, și probabil a semințelor unor specii (prin reducerea la minimum a funcțiilor metabolice).

DIVIZIUNEA CELULARĂ CONTROLATĂ ȘI „NEMURIREA"

Permanentizarea plantelor

Cultura *in vitro* a țesuturilor și celulelor prelevate din vîrfurile de creștere ale tulpinilor și rădăcinilor din genotipurile incluse în stocurile de resurse genetice este una dintre cele mai eficace metode de prezervare a fondului de gene. Așa cum s-a menționat, în vîrfurile de creștere ale tulpinii, în meristeme (mici agregate de celule rămase embrionice) continuă să se diferențieze noi țesuturi și organe de-a lungul întregii vieți a plantei după un plan bine stabilit (genetic), atîta timp cît procesul de înflorire nu a fost inițiat. Din acest punct de vedere meristemele pot fi comparate cu niște embri-

oni permanenți; cu alte cuvinte embriogeneza la plante este nelimitată. Aceste procese din meristemul apical au la bază o activitate mitotică intensă.

Pe baza experiențelor lui Haberlandt, din 1902, și apoi în 1939, datorită studiilor lui White, în S.U.A., Gautheret și Nobécourt, în Franța, cercetătorii au putut să considere apexul tulpinii o unitate autoperpetuă, pe care l-au excizat și l-au pus să crească în diferite medii nutritive. Astfel, s-a observat că agregatele celulare meristematice sînt capabile să funcționeze și să reconstituie o nouă plantă în afara corpului organismului originar datorită fenomenului de totipotență. Chiar și alte celule, diferențiate morfofuncțional, prelevate din organe și țesuturi mature, puse pe medii de cultură adecvate, pot să revină la stadiul de celule embrionare, să se dediferențieze și să manifeste totipotență. Deocamdată, *in vitro*, au fost regenerate plante întregi la puține specii, mai ales la acelea care regenerează ușor și *in vivo*. La multe specii, inclusiv la cereale, din explante cultivate *in vitro* au fost obținute agregate celulare — calus. Un pas important a fost făcut. Urmează ca prin influențarea mediilor de cultură, îndeosebi prin suplimentarea acestora cu substanțe de creștere, în general prin crearea unor condiții corespunzătoare, să se poată regenera plante întregi *in vitro* la toate speciile vegetale.

Într-un alt capitol s-a arătat că prin extinderea cunoștințelor și tehnicilor de manipulare genetică *in vitro*, create și aplicate la bacterii, s-au obținut însemnate succese și la plantele superioare. Astfel, pe de o parte, se realizează manipulări celulare: micromultiplicarea clonală a soiurilor valoroase, eradicarea virozelor, extinderea variabilității genetice, selecția unor genotipuri superioare, hibridarea somatică etc., iar pe de altă parte, *in vitro* se realizează manipulări genetice asupra celulelor vegetale prin recombinarea controlată a ADN din nucleu, organite etc. Asigurînd multiplicarea clonală, tehnicile de manipulare celulară *in vitro*, devin un instrument extrem de eficace pentru prezervarea zestrei de gene existente în prezent pe Terra. Aplicarea tehnicilor de cultură *in vitro* la genotipurile actuale, care nu pot fi stocate și prezervate prin sămînță sau paralel asupra stocurilor depuse sub formă de sămînță, vor asigura supraviețuirea, continuitatea, chiar permanentizarea actualelor specii și forme de plante în patrimoniul genetic vegetal.

Păstrarea pe termen lung a meristemelor, în bănci de gene prin cultură *in vitro* prezintă trei avantaje majore: 1) volumul lor mic și dezvoltarea foarte înceată (o diviziune mitotică la 18—24 ore în funcție de temperatură); 2) multiplicarea lor cu foarte mare viteză (prin clonare); 3) păstrarea lor cu ușurință în stare liberă de viruși, dăunători paraziți, fungi sau bacterii.

În eprubete, noile plantule sînt foarte mici, în miniatură și pe mediu de agar plantele se dezvoltă foarte lent, mai ales cînd din mediu au fost consumate unele substanțe nutritive. Plantele pot rămîne în aceeași stare multe luni, practic fără creștere. Dupa circa 6 luni, sau în fiecare an, plantele se clonează, iar explantul tulpinal cu un nod și o frunză se transferă, în condiții aseptice, pe mediu de cultură, într-o nouă eprubetă. La vița de vie și, în general, la plantele lemnoase, prezervarea genotipurilor prin cultură *in vitro* reduce spațiu, timp și mulți bani. Astfel, la vița de vie, pentru păstrarea în cîmp a 1 000 de soiuri în 6 repetiții (6 plante din fiecare soi) socotind doar 1,5 m²/plantă (6 × 1,5m²/soi) este necesară suprafața de un hectar (plus prașile, fertilizări, pliviri, stropiri, legări) în timp ce în laborator, *in vitro*, același material poate fi păstrat în 6 000 eprubete care ocupă mai puțin de 3 m². Pentru dezvoltare explantul aplical este plasat într-un mediu cu IAA (acid indol acetic), la o concentrație mare de potasiu, la temperatura de 20°C și la iluminarea zilnică timp de 12 ore cu intensitatea de 3 000 lucși. Apoi plantele sînt trecute pe un mediu cu o concentrație mică de potasiu, fără auxine, pe care, după 3 luni plantula atinge 10 cm. Plantulele pot fi clonate (un nod+o frunză) pentru înmulțire sau sînt prezervate pe termen lung pe un mediu sărac la 9°C, condiții în care plantele, practic, nu mai cresc. După 250 — 300 zile plantele sînt din nou clonate și trecute pe medii și în condiții favorabile regenerării... și așa pot fi păstrate pe perioade nedefinite.

În caz de necesitate fiecare asemenea plantulă poate fi multiplicată foarte rapid prin explante de țesut sau de celule. Din fiecare meristem în cultură se poate produce anual pînă la 10 milioane de explante-plantule. Ținînd seamă că la multiplicarea inițială a fost folosit un explant foarte mic din apexul tulpinal, liber de viruși și alți agenți patogeni care invadează țesuturile și celulele, iar cultura *in vitro* este asep-

tică, și stocurile genetice prezervate prin această modalitate vor fi sănătoase.

În culturile *in vitro* mediul și componentele sale trebuie studiate și alese cu grijă pentru a nu induce schimbări în plasma germinativă a stocurilor supuse prezervării (instabilitate cariologică, aberații structurale cromozomale, mutații genice). În general, s-a stabilit că explantele nemeristematice în cultură *in vitro* suferă mari variații în structura nucleară (în special poliploidie care la majoritatea speciilor preexistă în explantul inițial, *in vivo*). Sigur că pentru inducerea variabilității genetice apariția schimbărilor în plasma germinativă prezintă mare importanță. Pentru stocurile supuse prezervării schimbările genetice sînt dăunătoare, deoarece alterează genotipul și, respectiv, fenotipul. O mare stabilitate manifestă în cultură *in vitro* explantele meristematice mici și liniile clonale rezultate din acestea, așa-numitele „mericlone"(clone derivate din meristeme). Din aceste cauze la înființarea culturilor de țesuturi și celule în vederea stocării genotipurilor pe termen lung, se efectuează analiza cariologică a unor celule din fiecare explant meristemic. Se supun păstrării doar explantele cariologic normale, similare în cariotip stocului original.

O metodă ideală pentru prezervarea țesuturilor vegetale, ca și la microorganisme, culturi de celule animale, gameți animali (spermatozoizi) ar consta în conservarea țesuturilor meristematice la temperaturi scăzute, în aer lichid. În acest sens au fost făcute diverse cercetări, care au dus la concluzia că unele dintre principiile stabilite prin studiul celulelor animale și microorganismelor sînt aplicabile și celulelor vegetale. Astfel, s-a stabilit că supraviețuirea celulelor plantelor la temperatură foarte scăzută este dependentă de precizia controlării ratelor răcirii și încălzirii și că unele substanțe (așa-numiții „cryoprotectanți", unii care pătrund în celulă; cu greutate moleculară mare: glicerol, dimetilsulfoxid, alții care nu pătrund sau pătrund încet în celulă, cu greutate moleculară mică: zaharoză și cu greutate moleculară mare: polivinilpirolidon, dextran și unele proteine) sînt capabile să protejeze celulele de dăunare prin îngheț. Se consideră că rata de răcire optimă (sub zero grade), care cauzează celulei cele mai mici daune, este aceea care permite ieșirea treptată a apei din celulă înainte de înghețare, dar destul de rapid ca să se prevină creșterea concentrațiilor de săruri dăunătoare celulei. (Rata optimă de încălzire a celulelor prezervate prin frig este aceea care previne formarea gheții intracelulă prin recristalizare în timpul perioadei de încălzire). Răcirea optimă în prezența protectanților poate asigura păstrarea pe termen lung a celulelor la —130°C sau în azot lichid la —196°C. Precizarea tehnicilor de răcire și încălzire este în curs.

Așadar culturile de meristeme apicale pentru prezervarea pe tremen lung a multora dintre plantele valoroase cultivate care obișnuit se înmulțesc vegetativ (viță de vie, cartof, pomi, flori, căpșun, batat, trestie de zahăr etc.) prezintă avantaje foarte mari. Astfel, în spații mici pot fi păstrate colecții uriașe la costuri foarte scăzute. În prezent este potrivită prezervarea speciilor așa-zise ortodoxe prin intermediul semințelor la temperaturi foarte scăzute, dar odată cu perfecționarea tehnicilor, prin culturi *in vitro* vor putea fi stocate și alte specii. Consecințe deosebit de favorabile **ar** avea prezervarea pe termen lung prin cultură *in vitro* a speciilor și soiurilor cu semințe uleioase (floarea-soarelui, bumbac, in, dovleac, cînepă, rapiță ș.a.), proteice (fasole, lupin, arahide, mazăre, soia precum și citrice, cacao, cafea etc.) ca și a acelora cu fructe mari (nuc, castan comestibil, alun, stejar etc.).

Diviziunea celulară mitotică în condiții controlate va putea conferi astfel nemurire formelor actuale de plante cultivate sau spontane, ferindu-le de numeroase adversități și cedîndu-le generațiilor ce vin ca sursă de hrană, îmbrăcăminte, medicamente, agrement, ca mediu de viață și generator al vieții.

Conservarea celulelor animale fără dată limită

Pentru creșterea animalelor domestice, păstrarea și utilizarea spermei conservate, prelevată de la reproducători masculi valoroși genetic și productiv, a însemnat un progres rapid și remarcabil în direcția ameliorarii. Acest progres a fost posibil mai ales pe baza cercetărilor efectuate de englezii T. Mann (1964) și C. Polge (1972) care au determinat dezvoltarea tehnicilor de păstrare a spermei la temperaturi scăzute. În prezent, sperma unui mic număr de reproducători, dar cu valoare individuală ridicată, preparată în doze științific potrivite, introdusă în fiole, plasate la temperatură scăzută, circulă de-a lungul și de-a latul unor țări, a globului, pentru

însămînțarea artificială a taurinelor, ovinelor, suinelor, păsărilor, albinelor etc.

Noile tehnici creează însă condiții și pentru păstrarea pe termen nedefinit a spermei congelate în „bănci de spermă". În aceste „bănci de spermă" este prezervată nu numai sperma genitorilor masculi „de profesie" (valoroși genetic și productiv), ci și sperma prelevată de la masculii unor rase eliminate sau pe cale de a fi eliminate din sistemele de creștere din cauza productivității scăzute, precum și sperma prelevată de la masculii unor specii sălbatice, mai ales al celor pe cale de dispariție. Trebuie spus că pericolul dispariției paște mult mai presant speciile de animale pentru care într-un ecosistem spațiul de supraviețuire a unei singure perechi de indivizi este mult mai mare comparativ cu cel necesar supraviețuirii unei populații întregi dintr-o specie vegetală. În acest sens menționăm un raport de dispariție al speciilor de viețuitoare: o specie vegetală dispărută la 30 de specii animale dispărute. Raportul este cît se poate de elocvent.

Băncile de spermă pot păstra sperma prelevată de la toate speciile de animale actuale ca și de la toate subspeciile, rasele, genotipurile ce formează fauna de pe glob. Aceasta poate fi folosită în vederea ameliorării raselor de animale prin încrucișări interrasiale sau interspecifice, cît și prin infuzarea de gene străine, mai ales în scopul ridicării nivelului rezistenței la boli și dăunători. Dar, din băncile de spermă, cu datele caracteristice sădite în memoria computerelor, cîndva, peste ani, secole, milenii chiar, se vor putea extrage doze de spermă pentru însămînțarea artificială... a căror femele? Să sperăm că „masacrul biologic" se va diminua, se va opri chiar și că din speciile actuale de animale, inclusiv din cele 1 200 specii în gravă primejdie de dispariție, se va găsi încă un număr corespunzător de femele pentru însămînțare, fecundare și înmulțire.

Deci prezervarea spermei este o soluție pe jumătate sau nulă...

Prezervarea trebuie să fie totală, să asigure resuscitarea animalului întreg, pe de o parte, prin existența recipientului — mamă adoptivă, iar pe de altă parte, prin prezervarea de zigoți, embrioni sau, în general, a unor celule diploide capabile, prin incubare în condiții adecvate, să embriogenizeze și să reconstituie integral animalul.

După cum s-a arătat într-un alt capitol, cercetările din 1972 ale lui Whittingham și colaboratorii săi au asigurat „supraviețuirea embrionilor de șoarece înghețați la —196°C și —269°C". După prezervare, practic, pe o durată nelimitată, și după decongelare, embrionii, pe mediu de cultură, reiau diviziunea celulară, iar prin implantare în uter ei au nidat și au continuat normal embriogeneza în mamele gazdă. La termenul firesc s-au născut pui normali. De la șoarece, prin adaptare și perfecționare, tehnicile de prezervare a embrionilor au fost folosite cu succes, începînd din 1974 la ovine, iar din 1979 și la bovine.

Congelarea embrionilor de bovine este dificilă datorită cristalizării lichidelor din citoplasmă. Aceasta impune includerea în mediul nutritiv al embrionilor a unei substanțe crioprotective. De exemplu biologi din U.R.S.S., în 1979 — 1980, în prezența unui crioprotector au înghețat embrionii în două etape: în prima, temperatura a fost scăzută foarte lent (una sau două zecimi de grad/minut) pînă la —60°C, în a doua viteza înghețării a crescut rapid, pînă la temperatura azotului lichid: —196°C. O revistă sovietică scrie următorul caz: unui embrion taurin de aproape o săptămînă a fost supus hibernării timp de 72 ore la o temperatură de —196°C, după care a fost transplantat în uterul unei vaci. La nouă luni s-a născut un vițel normal, botezat de creatori „Hibernatus".

Aceste succese permit reflecția că embrionii tuturor mamiferelor, inclusiv umani, după congelare pot fi prezervați în „bănci de embrioni". La fel vor putea fi conservați prin congelare embrionii oricărei specii animale care posedă cantități de apă și vitelus similare celor existente în embrionii bovinelor. În aprilie 1981, o echipă de medici australieni condusă de profesorul C. Wood, a anunțat o veritabilă premieră: congelarea unei duzini de embrioni umani (pînă la —196°C, în azot lichid; în afara uterului embrionii pot supraviețui pînă la 36 ore), destinați a fi implantați în uterul unor femei sterile. Decongelarea unora dintre embrioni a arătat că aceștia sînt normali căci pe mediu de cultură reiau diviziunea celulară. S-a declarat că din cinci embrioni congelați și implantați în uterul unor mame sterile s-au născut trei copii. Va fi rezolvată conservarea embrionilor păsărilor, amfibienilor, șerpilor, peștilor ș.a. la care ouăle conțin cantități enorme de apă și vitelus? Ce nu poate realiza însă ingenioasa

minte omenească? Oare nu a fost obținut în realitate un embrion activ dintr-o celulă corporală umană introdusă într-un ovul enucleat (experiențele lui Shettles, 1978), iar literatura științifică, chiar dacă o plasăm în domeniul science-fiction, nu menționează crearea unei copii genetice prin clonarea unui om: plasarea nucleului diploid al unei celule somatice într-un ovul enucleat, implantarea acestei celule - zigot în uterul unei mame adoptive și nașterea unui copil, normal, în 1976, care era însă geamăn al tatălui său?

Poate trăi o femeie o mie de ani?

Și femeile se pot clona și, ca urmare, pot da naștere nu unor fiice, ci unor surori gemene mamei. Prezentăm tehnica pentru că ea asigură atît multiplicarea prin manipulare genetică, cît și prezervarea genotipurilor animale (mamifere): se prelevă din uterul unei femei oarecare un embrion după prima sau a doua segmentare, deci în stadiul de două celule sau patru celule (se rețin embrionii cu formula cromozomală XX, caracteristică sexului femel). Se separă aceste celule identice fapt ce permite obținerea a două sau patru celule zigot. Apoi una dintre aceste celule este reintrodusă în uterul din care a fost prelevat embrionul. Se va naște astfel o fiică bună. Restul celulelor zigot se plasează în congelator sub control. Cînd această fiică bună ajunge la maturitate sexuală și de reproducere poate fi folosită ca mamă adoptivă prin implantare în uterul său a unei celule-zigot ... scoasă din congelator. Această mamă adoptivă va naște pe propria sa soră geamănă... care, la rîndul ei, va putea naște o soră geamănă ei însăși și așa experiența poate dura ușor pînă la 1000 de ani (dacă cu ajutorul hormonilor se induc 20 ovulații la o femeie, ovulele se fecundează artificial cu spermatozoizi purtători ai cromozomului X, fiecare embrion se separă după prima segmentare, iar implantarea zigoților congelați se face la 24 de ani; 40 celule-zigot × 25 ani generația; dacă celulele embrionilor se separă după a doua segmentare, se pot obține copii conforme timp de 80 de generații). Să ne imaginăm conviețuirea în anul 3000 a patru generații de surori gemene, copii genetice identice, de vîrste diferite: 80, 55, 30 și 5 ani, povestind despre surorile lor dublete, care au trăit și săvîrșit din viață în zorii trimileniului...

Aceleași posibilități le-ar avea și clonii embrionari purtători ai cromozomilor sexului XY... numai că același trunchi va crește repetat în mame adoptive succesive... dar, atît recipienta mamă, cît și fiul născut, pot fi indivizi clonați din embrioni rezultați de la același cuplu parental original, înseamnă că mama nu naște un fiu ci un frate geamăn...

ARCA SĂ PLUTEASCĂ ...

Temeri și speranțe se pot împleti în viitorul apropiat, care, se pot detașa spre rău sau spre bine.

Spre rău... În diverse cercuri de specialiști, dar și de nespecialiști, îndeosebi politicieni, se vorbește destul de insistent de unele pericole potențiale pe care actualul progres al geneticii îl prezintă pentru omenire, de posibile accidente genetice la scară regională, națională sau planetară. Aceste pericole potențiale, adăugate la degradarea sau chiar distrugerea echilibrului ecologic, datorită tehnologiilor actuale, și presiunilor militare, împreună cu inducerea de tot mai multe schimbări dăunătoare în plasma germinativă, amenință calitatea și însăși existența vieții. Amenințarea la adresa vieții ia proporții înfricoșătoare dacă ne gîndim la primejdia nucleară, numită pe bună dreptate „epidemia finală", care nu va lăsa supraviețuitori.

Profunda îngrijorare provocată de amploarea cursei înarmărilor, de uriașa acumulare de armament, în primul rînd nuclear, a determinat pe președintele Nicolae Ceaușescu ca la grandioasa adunare populară consacrată dezarmării și păcii, ținută în București în decembrie 1981, să declare: „Amplificarea considerabilă a arsenalului atomic de pe continentul nostru creează pericolul unui război nuclear care poate distruge întreaga Europă, întreaga lume. Sînt în pericol minunatele cuceriri ale științei, roadele evoluției naturii, mărețele realizări ale societății umane. Este în pericol creația cea mai de preț, creația supremă a naturii — omul, viața însăși!"[1]

În această atmosferă oameni de știință, scriitori, de bună credință, apărători ai ecosistemului, luptători pentru supra-

[1] Ceaușescu N., *Cuvîntare ținută la grandioasa adunare populară consacrată dezarmării și păcii* din București, la 5 decembrie 1981, Scînteia Nr. 12221, 6 XII 1981.

viețuire, încadrați sau nu în vreo mișcare ecologistă sau pentru pace, dar conștienți că tehnologiile moderne și pericolul atomic sînt agresiuni fatale, pentru a atrage atenția opiniei publice și a-i activiza atitudinea, în diverse studii și publicații, demască consecințele îngrozitoare ale actualului curs al înarmărilor. Multiplele agresiuni grave asupra ambianței (care în prezent menține societatea umană pe o treaptă acceptabilă de civilizație) a determinat pe unii scriitori de știință-ficțiune să imagineze „scenarii" ale posibilului sfîrșit al lumii. Sînt cuantificate 20 de variante ale sfîrșitului, unele obiective, altele principial subiective. Variantele obiective sînt îndepărtate. Dar cauzele subiective ale unui posibil sfîrșit au fost relevate chiar de oameni de știință și sînt tocmai acelea care sub un fel sau altul implică omul și acțiunile sale. Iată cîteva:

— Un război total cu armele cele mai diverse: nucleare, cu neutroni, razele morții, gaze toxice, bazate pe bacterii, viruși ș.a. Ce s-ar alege de viață, de Pămînt? Detonarea doar a 10% din proiectilele nucleare existente, chiar dacă lumea este atinsă limitat, ar distruge în proporție de 70-80% stratul protector de ozon dînd astfel frîu liber razelor ultraviolete ucigașe. Detonarea a 10-20% din încărcăturile atomice ar degaja o lumină atît de puternică încît toate viețuitoarele ar orbi. Unii oameni și-ar putea proteja vederea cu ajutorul ochelarilor negri. Dar animalele n-ar avea cum să se ferească și pînă la urmă cu lumina ochilor stinsă, ar pieri toate. Întregul sistem al Terrei s-ar prăbuși...;

— Sărăcirea plasmei germinative umane. Ființele omenești n-ar mai reproduce decît tare și boli ereditare. Cauzele? Înmulțirea aberațiilor genetice sub acțiunea mutagenă a miilor de substanțe sintetice în uz. Acumularea acestora ar determina involuția omului. Asemenea curs ar fi grăbit de eventuale erori repetate în manipulările genetice care ar provoca maladii noi și, practic, incurabile. Adăugarea la această debilitare genetică a agresiunilor grave împotriva sistemelor ecologice esențiale reprezentate de expansiunile industriale ar duce la prăbușirea civilizației...

— Foametea, ca urmare a decalajului între creșterea populației și aceea a produselor alimentare. Locuitorii planetei n-ar mai avea cu ce să se hrănească...

Spre bine... Din numeroasele probleme dezbătute în această lucrare răzbește irezistibil, ca lumina zilei, capacitatea, practic nelimitată, a omului de a dezvolta activități utile, mai productive. Oamenii de știință, de astă dată în primul rînd cei chemați să cerceteze, să cunoască și să dea un curs sănătos vieții, au demonstrat ingeniozitatea în aplicarea cunoștințelor și descoperirilor științifice. Din toate cele cunoscute se desprinde marea responsabilitate a omului de știință și îndeosebi a geneticianului. Sigur, omul de știință are responsabilități imediate față de munca sa și față de „beneficiar". În cazul geneticianului, alături de acestea, apar responsabilități în plus. Aș afirma chiar că dintre oamenii de știință geneticianul are unele din cele mai mari responsabilități, el fiind chemat să răspundă de cel mai prețios produs al naturii și evoluției: *plasma germinativă umană*.

Într-adevăr, cei angajați cu manipularea genelor, atît cei de ieri, cît și cei de azi, s-au găsit mereu la post. Mai întîi, au creat și au pus la dispoziția agricultorilor soiuri de plante și rase de animale tot mai productive și de o calitate tot mai bună. Acolo unde în trecut se recoltau cîțiva saci, actualele soiuri, cultivate științific, umplu zeci și sute de saci, vagoane, fiind în stare să îndestuleze omenirea. Noile rase de animale, adevărate „fabrici" de produse alimentare, așteaptă doar condiții favorabile de creștere și de întreținere pentru demonstrarea înaltei lor productivități.

Acțiunea de producere a substanțelor alimentare capătă valențe tot mai multe și mai active. Specii noi sînt incluse în circuitul de folosință, iar speciile vechi sînt reconstruite. Se obțin proteine din specii „toxice", hidrocarbonate din cele mai „banale" plante, iar produse farmaceutice ca și insecticide, fungicide, detergenți ș.a. sînt extrase și din cele mai „ordinare" buruieni. Astfel, cercetarea descoperă nu numai utilitățile biologice ale viețuitoarelor în ecosisteme, ci dă un sens util, uman, tot mai multor specii din mediul înconjurător. Bacteriile, algele, ciupercile, activele enzime, în condiții dintre cele mai modeste, sînt supuse, sînt „domesticite" și determinate să lucreze pentru a îmbogăți „masa" societății, pentru a apăra sănătatea omului și a-i da viață lungă.

Tehnologiile biologice, în exploatare sau în curs de perfecționare, prin excelență productive și curate, pot ridica productivitatea muncii umane, de-a lungul și de-a latul pămîntului,

contribuind nu numai la răspîndirea plantelor și animalelor valoroase, dar și la ridicarea nivelurilor de producție, la îmbunătățirea calității acesteia, la igienizarea ei. Aceste tehnologii vor avea rolul de a curăți și de a reface echilibrele biologice, vor păstra ecosistemele la un nivel corespunzător supraviețuirii zestrei de gene. Este de la sine înțeles că aceste efecte sînt posibile numai dacă industria, agricultura, transporturile, viața socială vor ține seama de cerințele ecosistemului, inducînd schimbări în sistemul productiv care să fie în armonie cu menținerea mediului măcar la structura actuală, prin reducerea drastică a poluării, a consumurilor exagerate de energie, prin reproiectarea și reorganizarea activităților economice și sociale într-un mod responsabil, util tuturor pe Terra.

Ingineria genetică, deși tînără, în numai un deceniu a revelat potențe uimitoare. Manipularea bacteriilor, a celulelor vegetale, și animale, a celulelor umane, dar mai ales recombinarea ADN, sub un strict control tehnic și moral, a determinat obținerea unor succese remarcabile. Uimirea, admirația și recunoștința cunoscătorilor și necunoscătorilor, în general, a oamenilor, se îndreaptă spre cei care au făcut ca bacteriile să producă insulină, interferon, substanțe de creștere, spre cei care au realizat fecundarea unor ovule *in vitro* pentru învingerea sterilității unor femei și a aduce zîmbet de copil în cămine, pentru cei care au produs primele autogrefe tămăduitoare de cancer, pentru cei care protejează oamenii și plantele de viruși, pentru cei care au dezvoltat tehnicile de nemurire a celulelor, a vieții...

Acord final

Toate aceste fapte îndeamnă la meditație: dacă în lume există atît cunoștințele cît și condițiile și mijloacele necesare ce ar mai trebui pentru ca „Arca" pe care plutim să evolueze spre țărmuri înverzite, ospitaliere, odihnitoare și stabile? Conștiința că actualul curs al omenirii cu toată presiunea unor forțe distructive uriașe, nu este implacabil negativ. „Răul final" poate fi prevenit și oprit iar mersul societății poate fi reorientate pe un făgaș favorabil vieții, spre crearea pentru omenire a unei istorii noi, esențialmente pașnică și prosperă. Iată rațiuni, răspunsuri și năzuințe de dorit a deveni scumpe tuturor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

(Vă recomandăm pentru a cunoaște mai mult)

- Bîlteanu Gh., Victor Bîrnaure: *Fitotehnie,* Edit. CERES, București, 1979.
- Commoner B.: *Cercul care se închide.* Edit. Politică, București, 1980.
- Crăciun T.: *Genetica plantelor horticole.* Edit. CERES, București, 1981.
- Crăciun T., V. Crăciun: *Mic dicționar de biologie.* Ed. Albatros, București, 1976.
- Davidescu D., V. Davidescu: *Agrochimia modernă.* Edit. Academiei Republicii Socialiste România, București, 1981.
- Dubinin N.P.: *Genetica moleculară și acțiunea radiațiilor asupra eredității.* Edit. Științifică, București, 1966.
- Frankel O.H., J.G. Hawkes: *Crop genetic resources for today and tomorrow.* Cambridge University Press, Cambridge, 1975.
- Ionescu Al.: *Algele — proteinele viitorului.* Edit. Științifică și Enciclopedică, București, 1980.
- Maximilian C.: *Aventura geneticii.* Edit. Albatros, București, 1978.
- Mesarovic M., E. Pestel: *Omenirea la răspîntie.* Edit. Politică, București, 1978.
- Old R.W., S.B. Primerose: *Principles of Gene Manipulation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980.
- Pătrașcu M.,: *Ingineria genetică și modelarea programată a plantelor.* Edit. CERES, București, 1981.
- Popescu-Vifor Ș.: *Genetica animală.* Edit. CERES, București, 1978.
- Prestipino G.: *Natura și societatea.* Edit. Politică, București, 1981.
- Raicu P.,: *Genetica.* Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1980.
- Szent-György A.,: *A trăi pentru viață.* Edit. Politică, București, 1981.
- Watson J.D.: *Biologia moleculară a genei.* Edit. Științifică, București, 1974.

— * * * *Anuarul Statistic al Republicii Socialiste România*. Direcția Centrală de Statistică, 1980, 1981.
— * * * *Culturile de țesuturi*. Lucrările Primului Simpozion de Culturi Vegetale *In Vitro*, Tipo Agronomia, Cluj-Napoca, 1981.
— * * * *Dicționar enciclopedic de imunologie*. Coordonatori: I. Moraru, E. Păunescu, Edit. Științifică și Enciclopedică, București, 1981.
— * * * *Ecologie și protecția ecosistemelor*. Sub redacția: Al. Ionescu, R. Stancu, Pitești, 1980.
— * * * *Ecologie și protecția ecosistemelor* * * *. Sub redacția: Al. Ionescu, G. Șorop, Craiova, 1982.
— * * * *Folosirea rațională a erbicidelor*. Lucrările celui de al II-lea Simpozion Național de Herbologie; Coordonarea științifică: I. Ceaușescu, C. Pintilie, N. Șarpe, Al. Ionescu, Pitești, 1980.
— * * * *Genetic Vulnerability of Major Crops*. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1972.
— * * * *Hérédité et manipulations genetiques*. Colecție Bibliotheque „Pour la Science", Belin, Edition francaise de Scientific American, Paris, 1968—1969—1971, 1973—1975, 1977.
— * * * *Probleme ale agriculturii contemporane*. Sub redacția: I. Ceaușescu, Al. Ionescu, Edit. CERES, București, 1977.
— * * * *Probleme de Genetică Teoretică și Aplicată*. Colecția revistei, editată de Institutul de Cercetări pentru Cereale și Plante Tehnice, Fundulea.
* * * *Science et Vie*. Colecția revistei și Colecția numerelor în afara seriei. Publicată de către „Excelsior Publications" S.A. Paris.

Lector: OLGA TURBATU
Tehnoredactor: CORNEL CRISTESCU

Bun de tipar 13.XII.1982. Apărut 1983.
Comanda nr. 2201
Coli de tipar 26



Comanda nr. 20.523
Combinatul poligrafic „Casa Scînteii",
Piața Scînteii nr. 1, București,
Republica Socialistă România